

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"



DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA STRUTTURALE E FUNZIONALE

TESI DI DOTTORATO IN BIOLOGIA APPLICATA XVIII CICLO
INDIRIZZO "ECOLOGIA TERRESTRE - PIANTE E SUOLO"

*Biodiversità della microflora edafica
in funzione della copertura vegetale in ambiente mediterraneo
mediate tecniche funzionali e molecolari*

Coordinatore

Prof. Maurilio De Felice

Candidata

Dott.ssa Anna Gentile

Tutore

Prof.ssa Flora Angela Rutigliano

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

ABSTRACT

Il suolo ospita un'enorme varietà di specie microbiche, la maggior parte delle quali ancora sconosciute. Il ruolo fondamentale svolto dalla componente microbica del suolo per il funzionamento degli ecosistemi terrestri è garantito dalla sua diversificazione (Giller et al., 1997). La conoscenza dei fattori che influenzano la diversità della microflora edafica è quindi di grande importanza ai fini della realizzazione di adeguati modelli di gestione degli ecosistemi. La copertura vegetale rappresenta uno dei principali fattori che influenzano la diversità della microflora edafica, poiché regola la qualità e la quantità delle risorse disponibili, compete con i microrganismi per i nutrienti e determina la formazione di microclimi (Wardle, 2002), quindi crea variabilità sia spaziale che temporale dei principali fattori che condizionano la struttura e la composizione delle comunità edafiche.

L'ambiente mediterraneo è caratterizzato da una grande eterogeneità della copertura vegetale, che riflette generalmente gli effetti dell'attività antropica. Gli studi presenti in letteratura sulla relazione tra copertura vegetale e caratteristiche della comunità microbica del suolo raramente riguardano gli ecosistemi mediterranei.

In questo lavoro è stata valutata, in quattro casi studio di seguito riportati, l'influenza della copertura vegetale sulla diversità della microflora edafica di suoli prelevati in area mediterranea.

La diversità della comunità microbica è stata valutata in termini di diversità funzionale (Catabolic Evenness, Degens et al., 2000) e, per il quarto caso studio, anche in termini di diversità genetica (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Muyzer et al., 1993). Sono state inoltre effettuate misure di biomassa (Substrate Induced Respiration, Sparling, 1995; Degens et al., 2001) ed attività microbica (Degens et al., 2000) e di alcune caratteristiche chimiche del suolo (pH, carbonio organico, tenore idrico).

Nel primo caso studio sono stati studiati gli effetti dell'introduzione, nel Parco Nazionale del Vesuvio, di una specie vegetale invasiva, *Robinia pseudoacacia* L., sulle caratteristiche della microflora edafica. A tale scopo il suolo di un robinieto è stato confrontato con il suolo di un bosco di *Quercus ilex* L., specie nativa, e con il suolo di un bosco di *Pinus pinea* L., specie introdotta dall'uomo, ma naturalizzata. I risultati hanno indicato che al suolo colonizzato dalla specie invasiva sono associati valori ridotti di biomassa ed attività microbica, oltre che di contenuto di carbonio organico, rispetto ai suoli della pineta e della lecceta. Inoltre i suoli colonizzati da specie introdotte dall'uomo (pino e robinia) sono caratterizzati da una minore diversità funzionale della comunità microbica.

Obiettivo del secondo caso studio è stato quello di valutare l'effetto dell'introduzione di specie vegetali autoctone, mediante interventi di ingegneria naturalistica, sulla comunità microbica del suolo. Gli interventi hanno avuto lo scopo di favorire la colonizzazione del suolo da parte delle piante, al fine di ridurre la mobilità del substrato, migliorare la qualità del suolo e quindi limitare il rischio di erosione. Gli impianti hanno avuto generalmente un lieve effetto positivo sulla qualità del suolo, anche se spesso non significativo, favorendo lo sviluppo, l'attività e/o la diversificazione della microflora edafica e talvolta incrementando la riserva di carbonio organico. Il fatto che gli impianti non abbiano prodotto effetti molto marcati probabilmente è dovuto al limitato periodo trascorso tra la realizzazione degli interventi e il prelievo di suolo (massimo due anni).

L'obiettivo del terzo caso studio è stato quello di valutare se lo sviluppo di una comunità di piante erbacee annuali potesse influenzare la microflora edafica all'interno di aree aperte della vegetazione arbustiva generate da un diverso tipo di disturbo antropico. A tale scopo lo studio è stato effettuato in suoli soggetti ad incendi sperimentali di differente intensità nel 2000 e in suolo non incendiato, dove l'interruzione della vegetazione arbustiva è stata probabilmente determinata dal taglio della vegetazione da parte dei forestali allo scopo di ridurre il rischio di incendi accidentali. Nelle aree di studio il suolo è stato prelevato nel corso dello sviluppo della comunità erbacea, dallo stadio di seme (marzo), a quello di plantula (aprile), a quello di pianta adulta (maggio) fino alla morte della parte epigea (luglio). I risultati hanno evidenziato che l'effetto dello sviluppo della comunità erbacea dipende dal tipo di disturbo che ha generato l'interruzione della vegetazione arbustiva. Solo il suolo sottoposto ad incendio intenso è risultato favorito dallo sviluppo delle piante erbacee, esso ha presentato infatti i valori più elevati di biomassa, attività e diversità microbica in concomitanza con il massimo sviluppo delle piante erbacee e i valori più bassi di tali parametri quando, nel periodo arido, muoiono le piante, suggerendo che in tale periodo la microflora è limitata sia dalla disponibilità idrica che dall'assenza di copertura vegetale. Al contrario nel suolo soggetto ad incendio leggero e nel suolo non incendiato è stato osservato soltanto un effetto limitante dell'aridità estiva sulla microflora edafica. Il suolo soggetto ad incendio intenso sembra pertanto ancora risentire dell'effetto dell'incendio, avvenuto quattro anni prima, come dimostra anche il fatto che la comunità microbica è risultata, nei primi due campionamenti, meno sviluppata, attiva e diversificata rispetto al suolo interessato da incendio leggero ed al suolo non incendiato.

Infine, nel quarto caso studio sono state studiate le variazioni della microflora edafica in aree a diversa copertura vegetale, in relazione al tempo trascorso dopo il taglio della

vegetazione, rispettivamente un pratello, una comunità ad arbusti bassi e una comunità di macchia. Il suolo è stato campionato in primavera, dopo un lungo periodo piovoso, ed in autunno, al termine di una prolungata siccità estiva, in modo da tener conto anche della disponibilità idrica, essendo l'acqua il principale fattore limitante in ambiente mediterraneo. In questo studio oltre alla diversità funzionale, la biomassa e l'attività microbica, è stata determinata anche la diversità genetica della comunità microbica. L'analisi molecolare ha richiesto che fosse dapprima effettuato un confronto tra due diversi metodi di estrazione del DNA dal suolo, uno basato sulla lisi enzimatica ed uno basato sulla lisi meccanica, per poter individuare la procedura più adatta, in fatto di rese, al tipo di suolo analizzato, che è prevalentemente sabbioso e quindi presenta uno scarso contenuto in DNA. Il metodo di lisi meccanica si è dimostrato più efficace ed è stato adottato in questo caso studio. Inoltre è stato necessario confrontare diverse tecniche per la purificazione e la quantificazione del DNA (elettroforetica, spettrofotometrica e fluorimetrica) e tra queste la tecnica fluorimetrica è apparsa la più sensibile. I risultati del quarto caso studio hanno indicato che la comunità microbica è influenzata più dalla variazione stagionale della disponibilità idrica che dalla copertura vegetale e che l'effetto della copertura vegetale è apparso evidente, sebbene soltanto per l'attività microbica e per la composizione della comunità batterica, generalmente solo in condizioni idriche limitanti. Inoltre non è stata rilevata una relazione tra diversità genetica e funzionale della microflora edafica indicando che il funzionamento della comunità microbica non sia legato alla sua composizione. L'insieme dei risultati ottenuti ha evidenziato che la copertura vegetale costituisce un importante fattore di regolazione del funzionamento e della composizione della microflora edafica in area mediterranea e che il suo effetto può dipendere da altri fattori ecologici, quali la disponibilità idrica ed eventuali fattori di disturbo antropico. La comunità microbica è risultata più sensibile ai cambiamenti dei fattori ambientali rispetto alla sostanza organica del suolo e quindi costituisce un indicatore più idoneo a rappresentare lo stato di salute del suolo. Tuttavia poiché i differenti parametri microbici non mostrano la stessa sensibilità alla variazione dei fattori ambientali, è opportuno considerare simultaneamente diversi parametri che descrivano complessivamente la comunità stessa, ossia parametri indicatori del suo sviluppo (biomassa), della sua attività (respirazione) e della sua diversità.

CAPITOLO I

INTRODUZIONE

1.1 IL SUOLO COME SISTEMA BIOLOGICO

Il suolo è un insieme bilanciato di particelle minerali, materia organica ed organismi viventi in un equilibrio dinamico. Esso rappresenta la base fisica degli insediamenti umani, l'habitat elettivo per le piante superiori e numerose specie animali, una zona di deposito e produzione di biomassa ed, inoltre, esplica funzioni di filtro, tamponamento e trasformazione fondamentali per la protezione delle acque di falda.

Il suolo ospita una ricca e diversificata comunità biotica, che è costituita da pedofauna e microflora, oltre che dalle radici delle piante. Ritz et al. (1996) riportano che un centimetro cubo di suolo di prateria ospita centinaia di milioni di batteri, decine di migliaia di protozoi, centinaia di metri di ife fungine, diverse centinaia di nematodi, acari ed insetti ed una miriade di altri organismi. Molte migliaia di specie animali trascorrono tutta o buona parte della loro vita nel suolo o nella lettiera (Coleman & Crossley, 1996). Si tratta di organismi di dimensioni variabili da pochi micron fino a diversi millimetri, che vengono generalmente classificati in base alle dimensioni corporee (Swift *et al.*, 1979) in microfauna, mesofauna macrofauna e megafauna (Fig. 1.1).

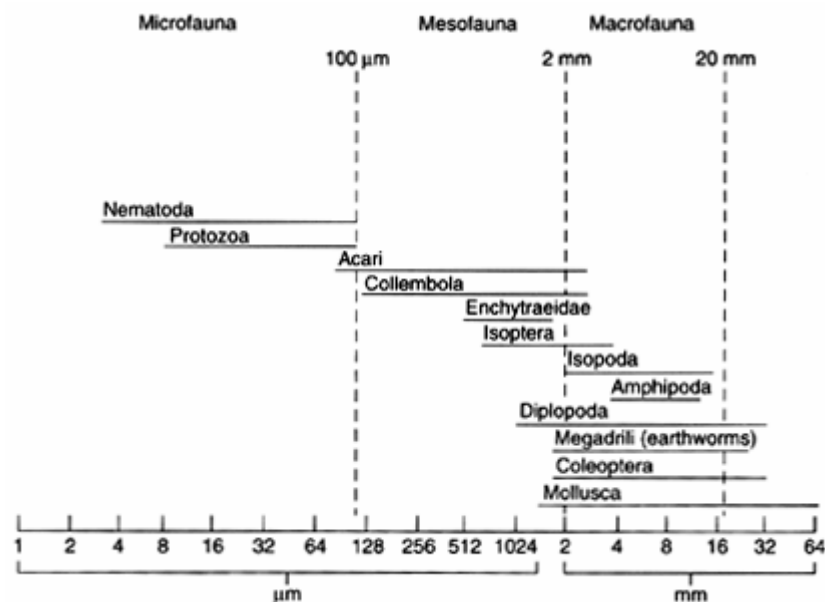


Fig. 1.1 Classificazione degli organismi viventi nel suolo in base alle dimensioni corporee (Da Swift et al., 1979).

E' tuttavia la microflora la componente più abbondante del suolo. Questa è costituita da un numero elevatissimo di specie microbiche, che includono batteri, attinomiceti, funghi e microalghe (Paul & Clark, 1996). I batteri sono gli organismi più numerosi del suolo, infatti un grammo di suolo può contenere fino a miliardi di batteri (Paul & Clark, 1996). Da studi condotti con metodi tradizionali di coltivazione è emerso che i batteri presenti nel suolo siano principalmente gram-positivi, in particolare varie specie dei generi *Clostridium* e *Bacillus*, attinomiceti (*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* e *Micrococcus*) ed il gruppo eterogeneo di organismi raggruppati nel genere *Pseudomonas*. Altri generi solitamente isolati dal suolo includono gli *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Caulobacter*, *Flavobacterium*, *Hyphomicrobium*, *Metallogenium*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Xanthomonas* (Liesak et al., 1997).

I funghi sono, dopo i batteri, gli organismi del suolo numericamente più abbondanti e costituiscono spesso i microrganismi dominanti in termini di biomassa, infatti possono costituire ben il 70-80 % del peso dell'intera biomassa microbica (Miller & Lodge, 1997). Ad esempio in una prateria situata nella fascia climatica temperata, la biomassa di batteri e funghi ammonta, rispettivamente, a 1-2 e 2-5 t ha⁻¹ (Pietramellara et al., 2002). I funghi più diffusi nel terreno appartengono ai generi *Mucor*, *Phthium*, *Fusarium*, *Tricoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus*.

Le alghe del suolo formano un gruppo piuttosto eterogeneo di organismi eucariotici unicellulari e multicellulari, mobili ed immobili, che comprende diverse centinaia di taxa differenti e vivono soprattutto nello strato più superficiale del suolo. Le alghe più rappresentate nel suolo sono le Diatomee, come la *Pinnularia* e la *Navicula*, le Cloroficee, come la *Clorella* e la *Clamydomonas*, le Cianoficee, come *Nostoc* e *Anabaena*. Questi organismi, essendo fotoautotrofi, hanno un ruolo ecologico chiave come colonizzatori primari delle superfici nude, come suoli vulcanici e versanti rocciosi, esposte alla radiazione solare.

Infine i virus sono gli organismi più piccoli (0,01-1 µm) e vivono generalmente da parassiti in piante, animali, batteri e occasionalmente funghi (Lavelle & Spain, 2001). Alcuni virus sono associati al suolo in maniera specifica. Di solito vengono trasmessi al suolo tramite nematodi o funghi. Se trasmessi da nematodi, si diffondono lentamente; se invece il mezzo di trasmissione è costituito dai funghi, ad esempio tramite dispersione aerea di spore infette operata dal vento o da animali, la diffusione è più veloce.

Nell'ambiente eterogeneo e generalmente povero in nutrienti e risorse energetiche (Stotzky, 1997), quale è il suolo, le diverse classi di microrganismi vivono in microhabitat

distinti, caratterizzati da diverse dimensioni: pochi μm per i batteri, meno di 100 μm per i funghi; tra 100 μm e 2 mm per Acari e Collemboli; tra 2 e 20 mm per gli Isopodi (Coleman & Crossley, 1996). Anche se lo spazio disponibile nel suolo è ampio, lo spazio biologico, ossia lo spazio occupato dai microrganismi viventi, rappresenta una piccola porzione, generalmente meno del 5% dell'intero spazio disponibile (Ingham et al., 1985). Tra le cellule batteriche e le particelle argillose c'è quasi un rapporto 1:1 ed è come se una cellula batterica fosse rivestita al massimo da un cristallo di minerale argilloso; le ife fungine sono generalmente circondate da uno strato di argille di spessore variabile tra 1 e 5 μm (Amato et al., 2004).

Molti studi, sebbene con approcci molto diversi, hanno rivelato che i procarioti e i piccoli eucarioti unicellulari vivono e svolgono il loro metabolismo prevalentemente all'interno di microaggregati del diametro inferiore a 20 μm , nei quali essi si trovano in condizioni idonee alla loro crescita e sfuggono alla predazione dei protozoi (Hattori e Hattori, 1976; Elliott et al., 1980; Foster, 1988). La formazione di aggregati pertanto conferisce stabilità biologica al suolo. D'altra parte, la microflora stessa favorisce la formazione di aggregati, principalmente mediante la produzione di mucillagini polisaccaridiche extracellulari, ma anche attraverso il fenomeno della bioadesione, che consiste nella capacità delle cellule procariotiche ed eucariotiche di aderire in modo aspecifico ad un qualsiasi substrato. L'adesione delle cellule alle particelle del suolo è dovuta sia alle cariche elettrostatiche che alle forze di tensione superficiale (Amato et al., 2004).

La comunità microbica del suolo svolge un ruolo fondamentale nel funzionamento degli ecosistemi terrestri poiché è la principale responsabile del processo di decomposizione della sostanza organica, che libera i nutrienti altrimenti immobilizzati nella necromassa, rendendoli così nuovamente disponibili per i produttori. Infatti, anche se la degradazione della sostanza organica include processi abiotici, quali l'alternanza di fenomeni di gelo e disgelo delle soluzioni intra ed extracellulari, che determina la rottura meccanica della lettiera, la lisciviazione ad opera dell'acqua piovana di minerali e di composti organici a basso peso molecolare idrosolubili, la mineralizzazione mediata dal fuoco e l'ossidazione spontanea della sostanza organica (Amato et al., 2004), sono gli organismi edafici che svolgono in modo preponderante tale funzione, ed in particolare i microrganismi, il cui contributo ai processi di decomposizione della sostanza organica del suolo è superiore al 90% (Lavelle e Spain, 2001). Solo batteri e funghi infatti posseggono complessivamente il corredo enzimatico necessario a degradare tutte le molecole organiche naturali, mentre la pedofauna svolge essenzialmente un ruolo indiretto. Essa infatti coadiuva l'attività

microbica in diversi modi (Edwards et al., 1970): triturando corpi di animali e di piante morti o parti di questi in modo da aumentarne la superficie esposta all'attacco microbico, disgregando e lisando i tessuti animali e vegetali che così diventano più suscettibili all'attacco microbico, modificando chimicamente i residui organici, formando aggregati tra la sostanza organica e la componente minerale del suolo, rimescolando la sostanza organica negli strati superficiali del suolo, influenzando l'attività e la biomassa dei decompositori, nonché la ricchezza e la composizione in specie delle loro comunità (Hanlon & Anderson, 1979; Parkinson et al., 1979), contribuendo alla dispersione delle spore e delle ife fungine (Nannipieri, 1993).

L'attività e la dinamica delle popolazioni di microrganismi del suolo possono essere influenzate da diversi fattori ecologici, quali le fonti di carbonio ed energia, il contenuto in nutrienti, i fattori di crescita, la disponibilità idrica, la temperatura, la pressione, la composizione atmosferica, le radiazioni elettromagnetiche, il pH, il potenziale ossido-riduttivo, la genetica dei microrganismi e le interazioni tra i microrganismi (Nannipieri et al., 2003), la copertura vegetale (Rutigliano et al., 2004). Tali fattori ecologici possono variare notevolmente nel tempo e nello spazio, ed è per questo che i microhabitat del suolo sono sistemi dinamici e che l'attività biologica non è uniformemente distribuita nel suolo. Esistono infatti "hot spots" caratterizzati da attività particolarmente intensa, quali siti con proprietà fisico-chimiche diverse rispetto alla restante parte del suolo (Sextone et al., 1985), siti di accumulo di materia organica (Parkin, 1987) o di letame (Petersen et al., 1996) o la rizosfera (Lynch, 1990; Pinton et al., 2001).

Il suolo per molti aspetti non è un habitat ottimale per gli organismi. Jenkinson et al. (1981) e Chaussod et al. (1986) sostengono che il metabolismo reale di tutti gli organismi che popolano il suolo sia relativamente più lento rispetto al metabolismo potenziale. Tale fenomeno è probabilmente dovuto all'insieme di interazioni ecologiche che si stabiliscono tra gli organismi del suolo (competizione per lo spazio ed i nutrienti, predazione, antibiosi), oltre che alle fluttuazioni dei fattori ambientali cui è soggetto il suolo, soprattutto nello strato superficiale nel quale si svolge la quasi totalità del metabolismo; la maggior parte degli autori ritiene pertanto largamente dormiente la pur abbondante biomassa e biodiversità ospitata nel suolo (Amato et al., 2004).

Il suolo agisce come sistema biologico non solo per il fatto che ospita organismi viventi, ma anche grazie alla sua capacità di adsorbire importanti molecole biologiche, quali proteine ed acidi nucleici. Tale proprietà consente ad alcuni enzimi extracellulari adsorbiti dai minerali argillosi o intrappolati nelle molecole di acidi umici di conservare la propria

attività, essendo in tal modo protetti dall'azione proteolitica e dalla denaturazione termica o dalle variazioni di pH (Nannipieri et al., 1990, 2002). Analogamente le molecole di DNA adsorbite o legate agli acidi umici, alle particelle di argilla e di sabbia sono protette dalla degradazione ad opera di nucleasi, ma possono ancora trasformare cellule batteriche competenti (Lorenz & Wackernagel, 1987; Khanna & Stotzky, 1992; Paget et al., 1992; Pietramellara et al., 1997).

Gli acidi nucleici sono presenti nel terreno in notevole quantità principalmente a seguito di fenomeni di lisi cellulare (Torsvik et al., 1990). Studi di spettroscopia ai raggi X hanno indicato che il DNA si lega alle particelle di argilla, principalmente montmorillonite (Greaves e Wilson, 1969; Khanna e Stotzky, 1992; Romanowsky et al., 1991), che sono caratterizzate da carica elettrica negativa, derivante prevalentemente da sostituzioni isomorfe (Radaelli and Calamai, 2001). Il processo di adsorbimento del DNA alle particelle argillose dipende dal pH del suolo (Greaves e Wilson, 1969; Khanna e Stotzky, 1992; Romanowsky et al., 1991). Dato che il DNA presenta un punto isoelettrico intorno a pH 5, per valori di pH minori esso presenta le basi azotate protonate con conseguente aumento della carica positiva della molecola. Ad un pH inferiore a 5, quindi, il DNA può essere più facilmente adsorbito sulla superficie dell'argilla per effetto dell'attrazione coulombiana tra le cariche positive e negative presenti, rispettivamente, sul DNA e sull'argilla. L'adsorbimento del DNA all'argilla può avvenire anche per la formazione di ponti tra i gruppi fosfato del DNA e le cariche negative dell'argilla, ad opera di cationi, come Na^+ o Ca^{2+} , presenti in forma idratata nel terreno, con un meccanismo di scambio grazie al quale un gruppo fosfato del DNA sostituisce la molecola di acqua legata al catione. Ciò è confermato dal fatto che l'aggiunta di elettroliti sembra far aumentare significativamente l'adsorbimento del DNA all'argilla (Greaves e Wilson, 1969; Khanna e Stotzky, 1992). I meccanismi coinvolti nell'adsorbimento e nel legame del DNA sui minerali argillosi non sono comunque ancora del tutto chiari. Tale interazione sembra coinvolgere anche legami idrogeno (Khanna and Stotzky, 1992), come avviene nell'interazione tra proteine e minerali argillosi (Ogram et al., 1994). I minerali argillosi risultano particolarmente reattivi nell'adsorbire il DNA extracellulare poiché 1 g di argilla (montmorillonite) può adsorbire fino a 30 mg di DNA, pari a circa 10^{13} *genomi* di *E. coli* (Bertolla and Simonet, 1999).

Il DNA presente nel suolo può legarsi anche agli acidi umici che ugualmente presentano cariche negative dovute alla presenza di gruppi funzionali superficiali. Un grammo di sostanza umica può adsorbire fino a 12-15 mg di DNA (Crecchio and Stotzky, 1998).

Fra i fattori ambientali che influenzano le interazioni e l'attività biologica del DNA adsorbito o legato ai colloidi del suolo sono importanti, oltre al pH (Greaves and Wilson, 1969; Khanna and Stotzky, 1992), il tipo di catione che satura la carica sul minerale argilloso (*charge-compensating cations*) (Greaves and Wilson, 1969; Paget et al., 1992), l'umidità, la temperatura, le condizioni di sterilità (Falk et al., 1963 a and b; Gallori et al., 1994; Pietramellara et al., 1997; Crecchio and Stotzky, 1998). Nell'adsorbimento del DNA sui colloidi risultano inoltre importanti le dimensioni della molecola, i gruppi fosforici dell'acido nucleico possono legarsi alle cariche positive presenti sui minerali argillosi.

Il DNA extracellulare associato con i fillosilicati (Gallori et al., 1994; Ogram et al., 1988) è stabile per periodi lunghi come dimostrato dalla difficoltà del desorbimento del DNA dal minerale argilloso con soluzioni di forza ionica differente, agenti chelanti e detersivi (Khanna and Stotzky, 1992; Lorenz and Wackernagel, 1994; Demanèche et al., 2001) e dalla resistenza di tale DNA, legato al minerale, alla degradazione batterica (Paget et al., 1992; Romanowski et al., 1992; Ceccherini et al., 2001).

Il DNA adsorbito sui colloidi del suolo può essere utilizzato dalle cellule batteriche; tale utilizzo dipende dalle caratteristiche del suolo o dei colloidi e della molecola di DNA (grandezza, struttura terziaria e grado di purezza) (Stotzky, 1989; Lorenz and Wackernagel, 1992 and 1994; Khanna and Stotzky, 1992; Paget and Simonet, 1994; Ceccherini et al., 2001; Ascher et al., 2002; Pietramellara et al., 2001 and 2002, a).

1.2 DIVERSITA' DELLE COMUNITA' MICROBICHE DEL SUOLO

La diversità biologica o biodiversità è l'espressione della varietà degli organismi viventi. Elemento chiave del funzionamento della biosfera, la diversità biologica si esprime come diversità di specie, diversità genetica, diversità paesaggistica, diversità degli ecosistemi (Fig. 1.2).

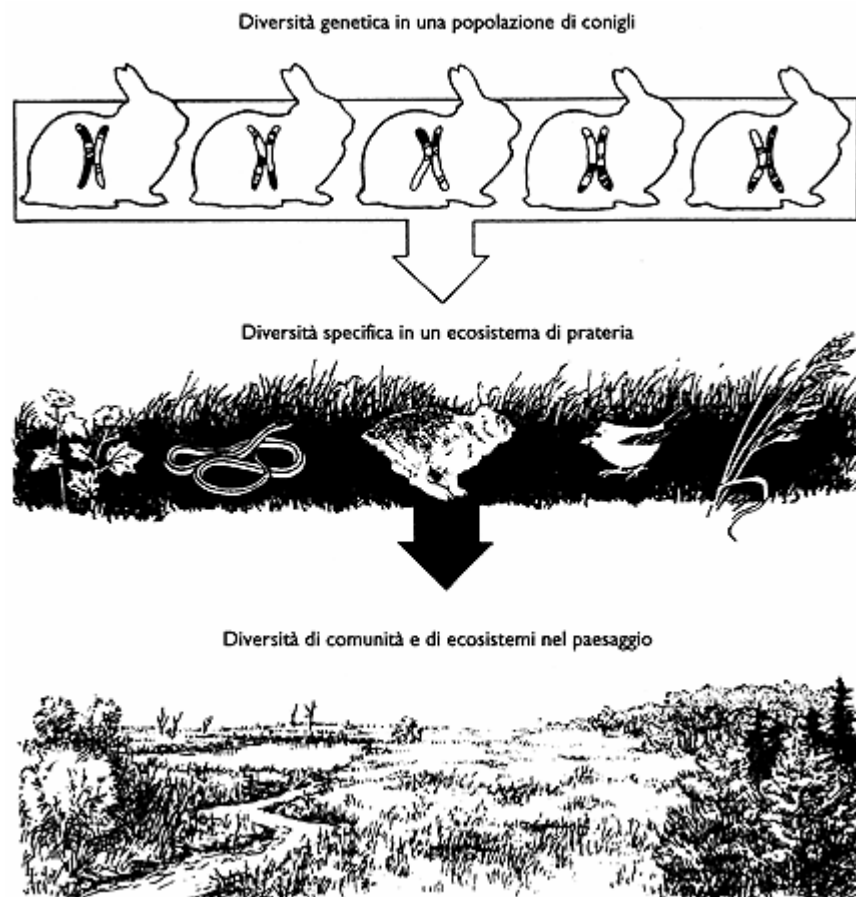


Fig. 1.2 - I tre livelli principali della diversità biologica: la diversità genetica (il numero e le frequenze geniche all'interno di una specie), la diversità specifica (il numero e le frequenze delle specie in un dato ecosistema) e la diversità di comunità o diversità ambientale (il numero e le estensioni relative dei tipi di habitat/ecosistema in una data regione (Da Ferrari, 2001).

In tutto il mondo la conservazione della biodiversità è riconosciuta come un valore universale. Nel 1992 centosettanta paesi hanno firmato la convenzione sulla diversità biologica a Rio di Janeiro, impegnandosi in questo modo a conservare il ricco tesoro della biodiversità sulla Terra. Tale conservazione si rivela un'attività essenziale, non solo per la

difesa di interessi umani come l'alimentazione, la salute, l'energia, ma anche per il mantenimento della natura ai fini di uno sviluppo sostenibile. Attualmente nella comunità scientifica c'è un particolare interesse per la conservazione della biodiversità e per il suo ruolo nel mantenimento della funzionalità degli ecosistemi (Fitter et al., 2005), pertanto lo studio della comunità microbica del suolo e dei fattori che la regolano non può prescindere dalla valutazione della sua diversità.

In studi recenti si assume che caratterizzando la diversità si può comprendere e controllare il funzionamento degli ecosistemi e che la capacità di ripresa di un ecosistema in seguito ad un disturbo dipende in parte dal grado di diversità dell'ecosistema (Nannipieri et al., 2003). L'importanza della biodiversità per la funzionalità degli ecosistemi è stata messa in rilievo dal protocollo internazionale di intenti Agenda 21, un documento stipulato in occasione della Conferenza delle Nazioni Unite su Ambiente e Sviluppo, tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992. Il documento ha avuto l'obiettivo di promuovere la cooperazione scientifica ed internazionale per una migliore comprensione dell'importanza della biodiversità e delle sue funzioni negli ecosistemi.

Il termine "diversità" è stato definito in vari modi (Liesack et al., 1997); negli studi di microbiologia tale termine è spesso utilizzato per descrivere il numero di specie differenti o, in termini molecolari, il numero di differenti sequenze geniche, presenti in un habitat; una misura completa della diversità tiene conto anche della relativa abbondanza di ciascuna componente biotica all'interno della comunità e le funzioni svolte da ciascuna componente (Punkhurst, 1997). La diversità di un sistema comprende, dunque, anche la diversità di funzioni che è caratterizzata dalla ricchezza delle funzioni e dalla omogeneità di espressione di tali funzioni. Infatti le funzioni che avvengono in un ecosistema sono molteplici, ma non sempre tutte le funzioni vengono svolte con la stessa efficienza.

Secondo Loreau e collaboratori (2001) un numero minimo di specie è essenziale per il funzionamento di un ecosistema in condizioni di equilibrio, mentre un maggior numero di specie è probabilmente necessario per il mantenimento di processi stabili in ecosistemi in continuo mutamento. Il ruolo ecologico della diversità tassonomica è dunque quello di assicurare che, in presenza di perturbazioni, vi siano comunque delle specie in grado di svolgere determinate funzioni (Bengtsson, 1998). Infatti, maggiore è il grado di biodiversità intra o interspecifica o funzionale di un ecosistema, maggiori saranno la sua tolleranza alle perturbazioni e la sua resilienza (Giller et al., 1997), poiché vi saranno più probabilità che vi siano genotipi o specie che possano svolgere le funzioni di quelli scomparsi. Dal momento che una elevata diversità tassonomica viene considerata

importante nel preservare la varietà di funzioni tipica della microflora edafica, molti autori preferiscono valutare la diversità e la complessità delle comunità microbiche del suolo da un punto di vista funzionale, anziché da un punto di vista tassonomico. Diversi autori (Andren & Balandreau, 1999; Bardgett & Shine, 1999) infatti ritengono che le caratteristiche funzionali delle diverse specie sono importanti per il mantenimento dei processi ecosistemici almeno quanto il numero di specie.

Diversi studi hanno messo in evidenza che esiste una ridondanza funzionale tra gli organismi (Andren & Balandreau, 1999; Bardgett & Shine, 1999). Tuttavia Beare et al. (1995) sostengono che, anche se una singola funzione può essere svolta da molte specie, organismi funzionalmente simili spesso occupano nicchie ecologiche differenti e quindi il loro ruolo nell'ecosistema non è sovrapponibile. Questi autori sostengono inoltre che la stabilità di un ecosistema non dipende tanto dalla sua ridondanza funzionale quanto dalla ricchezza di interazioni biotiche tra gli organismi e dall'importanza che queste hanno nella regolazione dei processi biogeochimici.

L'importanza di studiare i rapporti fra la funzionalità e la diversità microbica del suolo sta nel fatto che l'80-90% dei processi metabolici del suolo sono mediati da microrganismi (Kowalchuk and Smith, 1995; Coleman and Crossley, 1996; Ohtonen et al., 1997; Øvreås and Torsvik, 1998; Ceccherini et al., 2000; Nannipieri and Badalucco, 2003; Nannipieri et al., 2000 and 2003); inoltre il ruolo fondamentale che la componente microbica svolge per il funzionamento e la stabilità del sistema è garantito dalla sua diversificazione. Infatti nel suolo esiste un'enorme varietà di specie microbiche, la maggior parte delle quali ancora sconosciute. Un grammo di suolo può contenere 10^4 specie batteriche, di cui circa il 95% sono ancora non coltivabili (Sait, Hugenholtz & Janssen, 2002; Joseph et al., 2003). Il numero di genomi diversi riscontrabili in un campione di suolo lascia intuire che la sua ricchezza in specie è di gran lunga superiore al numero di specie attualmente identificate (Torsvik e Øvreås, 2002), infatti molte delle sequenze di rDNA scoperte nel suolo sono diverse da quelle osservate nei batteri già identificati (Paul & Clark, 1996).

Secondo O'Donnell et al. (2001) il problema centrale nella comprensione del legame tra diversità microbica e funzionalità del suolo è capire le relazioni esistenti tra diversità genetica e struttura della comunità e tra struttura e funzione della comunità.

1.3 FATTORI CHE INFLUENZANO DIVERSITA', SVILUPPO E ATTIVITA' DELLA COMUNITA' MICROBICA DEL SUOLO

Le caratteristiche della microflora edafica riflettono l'elevata eterogeneità spaziale e temporale del suolo, cosicché uno stesso tipo di suolo presenta notevoli variazioni locali nella composizione in specie delle comunità microbiche (Harris, 1994). L'elevata eterogeneità spaziale è causata dal basso tasso di mescolamento, dall'elevata estensione superficiale e dalla variabilità nello spazio di diversi fattori ecologici, quali il clima, il tipo di vegetazione, la fauna, l'impatto antropico (Liesack et al., 1997), la tessitura, la salinità, il pH, la disponibilità di nutrienti, l'input di materia organica. Alla eterogeneità spaziale si aggiunge l'eterogeneità temporale, legata alle variazioni stagionali del clima e della vegetazione (Bolton et al., 1993). Il tutto si traduce in un elevato numero di nicchie ecologiche.

Un importante fattore di regolazione della comunità microbica è rappresentato dal contenuto idrico del suolo, che è determinato sia dal clima che dalla tessitura del suolo. L'acqua, con le sostanze minerali, organiche ed i gas in essa contenuti, costituisce un mezzo nutritivo liquido per i microrganismi. Le cellule microbiche sono uccise per disseccamento, soltanto le forme più resistenti sopravvivono a lunghi periodi di siccità (Florenzano, 1983). Un terreno secco, conservato per 10 anni, subisce una diminuzione di 100 volte nella popolazione microbica (Florenzano, 1983); la sopravvivenza della microflora rimanente è dovuta alla presenza di strutture resistenti o probabilmente alla presenza di residui di acqua osmotica o igroscopica. Warcup (1957) ha osservato che i funghi sopravvivono a lunghi periodi di siccità nei suoli australiani sotto forma di spore, sclerozi, rizomorfe ed ife quiescenti. I cianobatteri sono capaci di sopravvivere a forti siccità e sono importanti colonizzatori di suoli desertici. La riumidificazione di suoli secchi ripristina le attività microbiche ed il livello di attività supera spesso quella preesistente all'essiccamento. L'effetto è stato spiegato con un incremento della solubilità dei nutrienti per riumidificazione o con un nuovo orientamento della materia organica, causato dal movimento di particelle e rottura di pori che rendono accessibili substrati che prima non lo erano. Inoltre l'essiccamento uccide alcuni microrganismi che diventano una fonte di nutrienti per quelli superstiti.

La temperatura del suolo influenza l'attività metabolica della microflora, in quanto le attività microbiche, come quelle di altri organismi pecilotermi, aumentano con l'aumentare della temperatura, sebbene temperature troppo elevate possano diventare limitanti. Per la grande maggioranza dei microrganismi del suolo l'intervallo ottimale di temperatura è

compreso tra i 25 ed i 37°C (Florenzano, 1983). Le basse temperature determinano una riduzione dell'attività dei microrganismi, ma non ne influenzano la sopravvivenza. Gli estremi di temperatura ai quali sono soggetti i microrganismi del suolo dipendono dalla loro posizione lungo il profilo del suolo e dalle condizioni climatiche dell'area considerata. La microflora che cresce in superficie può essere soggetta a notevoli cambiamenti di temperatura durante l'anno.

Anche il pH influenza notevolmente la microflora edafica. Una cellula batterica contiene circa 1000 enzimi; l'attività di tali enzimi è quasi sempre dipendente dai valori di pH (Paul & Clark, 1996). La maggior parte delle specie batteriche conosciute cresce a valori di pH compresi tra 4 e 9. I lattobacilli ad esempio crescono a pH compresi tra 4,3 e 6,8. I batteri acidofili crescono a pH compresi tra 1 e 6; gli acidofili estremi possono crescere anche a valori di pH compresi tra 1 e 3. A questo gruppo appartengono alcune specie di *Thiobacillus*, *Thermophilus* e *Sulfolobus*. In generale però i batteri e gli attinomiceti del suolo tollerano meno le condizioni acide rispetto ai funghi. Il pH critico per la maggior parte dei batteri e degli attinomiceti è intorno a 5, al di sotto del quale molti cessano di crescere. E' stata dimostrata l'esistenza di specie di *Streptomyces* acido-tolleranti (Florenzano, 1983). Alcuni batteri sono moderatamente basofili, come ad es. *Nitrosomonas* sp.pl., e crescono a valori di pH compresi tra 7,3 e 9,6. Esistono batteri caratterizzati da estrema basofilia, che crescono a pH 13. I funghi sono moderatamente acidofili; il range di pH ottimale per la loro crescita cade tra 4 e 6. Alcune specie fungine crescono in condizioni acide, pertanto in suoli, come i podzol, in cui il pH può essere di 3, i funghi costituiscono la componente dominante della microflora.

I microrganismi tellurici reagiscono in modo differente ai cambiamenti di concentrazione dei gas nell'atmosfera del suolo. Alcuni batteri sono strettamente anaerobi e non possono crescere in presenza di O₂ (ad es. *Clostridium tetani*, *C. pasteurianum*, *C. botulinum*), mentre altri sono strettamente aerobi (ad es. *Arthrobacter* sp.pl., *Pseudomonas fluorescens* e la maggior parte degli attinomiceti). Alcuni batteri crescono meglio a basse tensioni di O₂, e sono denominati microaerofili. I funghi sono aerobi stretti e, come in altri gruppi microbici, le relazioni tra crescita e disponibilità di ossigeno variano nelle diverse specie. La concentrazione di CO₂ nell'atmosfera del suolo è un altro importante fattore ecologico, in quanto può influenzare il pH del microhabitat, fornire carbonio ai microrganismi autotrofi ed esercitare un effetto inibitore differenziale sulla microflora eterotrofa.

Molti studi hanno evidenziato l'influenza della tessitura e della struttura del suolo e dell'isolamento spaziale sulla diversità e la struttura delle comunità microbiche (Nannipieri

et al., 2003). Sessitsch et al. (2001) hanno dimostrato che le dimensioni delle particelle del suolo hanno una grande influenza sulla struttura e sulla distribuzione delle comunità microbiche, per certi aspetti anche maggiore di altri fattori quali il pH e la quantità e qualità degli input organici: i loro risultati hanno mostrato che nelle frazioni granulometriche di minori dimensioni la diversità microbica era maggiore che nelle frazioni di maggiori dimensioni e che le comunità presentavano una elevata specificità per diverse classi granulometriche. Renjard e Richaume (2001) hanno analizzato la distribuzione spaziale dei batteri a livello di microhabitat ed hanno dimostrato che l'80% dei batteri era localizzato nei micropori di aggregati stabili, del diametro di 2-20 μm , dove trovavano condizioni favorevoli di disponibilità idrica e di substrati, di diffusione di gas e protezione dai predatori.

L'attività microbica del terreno è profondamente influenzata dalla presenza e/o dall'assenza di argille, in quanto queste hanno un ruolo importante nella formazione e nella stabilizzazione di aggregati composti da particelle di sabbia e limo (micronicchie), sono capaci di trattenere al loro interno una quantità di acqua sufficiente alla vita dei microrganismi e di adsorbire cationi in virtù delle cariche negative superficiali pertanto influenzano notevolmente i processi microbici e biochimici che avvengono nel suolo. Alcuni minerali argillosi presenti nel suolo influenzano in modo particolare l'attività della microflora tellurica. La montmorillonite, quando è presente in basse concentrazioni, riduce il tasso di respirazione fungina in vitro, mentre stimola le attività batteriche sia a basse che ad elevate concentrazioni (Lavelle e Spain, 2001). Tale stimolazione sarebbe dovuta alle proprietà fisico-chimiche della montmorillonite. Questo minerale con il suo latice espanso e l'alta superficie specifica, ha una considerevole capacità di scambio cationico e può tamponare il pH dei sistemi mediante la sostituzione degli ioni idrogeno, prodotti dal metabolismo microbico, con i cationi fondamentali del suo complesso di scambio. Così potrebbe aiutare a mantenere un pH favorevole alle attività batteriche. L'effetto inibitore sui funghi è attribuito all'alta viscosità della montmorillonite che impedisce la diffusione dell'ossigeno.

Anche la qualità dell'humus influenza le caratteristiche della microflora edafica (Ponge, 2003). L'humus di tipo *mor* presenta generalmente livelli estremamente bassi di biomassa, attività e diversità della microflora (Davis, 1981); il processo di formazione del complesso umico è lento, ma ancora più lenta è la sua decomposizione, per cui si ha accumulo più o meno rilevante di materia organica pre-umica. L'humus di tipo *mull* presenta livelli molto alti di attività, biomassa e diversità della microflora, soprattutto per quanto riguarda i

batteri, essendo questo tipo di humus molto ricco in particelle minerali, cui i batteri possono aderire; i processi di sintesi e decomposizione dell'humus sono in genere molto attivi. L'humus di tipo *moder* presenta caratteristiche intermedie tra il mull e il mor ed è tipico di suoli forestali che si trovano in una fase iniziale di degradazione, come per es. terre brune podzolizzate su pendii formati da rocce cristalline. A causa dell'elevato grado di acidità, la microflora tipica di questo humus è caratterizzata in prevalenza da funghi, che acidificano ulteriormente il suolo e producono antibiotici che contribuiscono a ridurre le popolazioni batteriche.

La diversità microbica diminuisce con la profondità lungo il profilo del suolo, così come le radici delle piante e la sostanza organica (Paul & Clark, 1996). Fattori quali le coltivazioni, il microclima, la copertura vegetale influenzano la distribuzione dei microrganismi lungo il profilo del suolo. Nel suolo di una piantagione di pioppi di circa due anni di età, Horwath (1993) ha osservato valori di biomassa fungina pari a $73 \mu\text{g C g}^{-1}$ in superficie e $25 \mu\text{g}$ nello strato sottostante e valori di biomassa batterica di $26 \mu\text{g C g}^{-1}$ in superficie e di $4 \mu\text{g}$ nello strato sottostante, con un rapporto tra biomassa fungina e batterica pari a 3 in superficie e 6 nello strato sottostante.

Nelle comunità vegetali ed animali la diversità di specie è fortemente influenzata dalla competizione interspecifica. Tiedje e collaboratori (2001) suggeriscono che non esiste invece una competizione all'interno delle comunità microbiche del suolo, in quanto le diverse specie microbiche che popolano il suolo sono spazialmente separate per la maggior parte del loro ciclo vitale, anche se un contatto, pur se di breve durata, tra i microhabitat microbici può avvenire immediatamente dopo la pioggia, quando cioè l'acqua forma ponti che collegano le varie particelle ed aggregati di suolo. Tuttavia l'ipotesi di microhabitat microbici generalmente separati non tiene conto del mescolamento e del trasporto di suolo operati dalla fauna e della stabilità delle comunità microbiche che vivono nei biofilm che si formano all'interfaccia tra radici e suolo e che non sono influenzati da condizioni di umidità o aridità (Nannipieri et al., 2003).

Uno studio condotto da Griffiths e collaboratori (1996), mediante tecniche di ibridazione del DNA, ha dimostrato che la diversità dei microrganismi varia con il tipo di suolo.

In uno studio effettuato utilizzando suoli prelevati in diverse riserve naturali e parchi di ecosistemi mediterranei e boreali in Australia, Africa, Cile, California e Russia, mirato a verificare se le specie microbiche sono ubiquitarie sul pianeta oppure sono peculiari delle diverse aree geografiche, Tiedje e collaboratori (2001) hanno messo in evidenza che il DNA di Pseudomonadi fluorescenti (analizzato mediante tecniche di fingerprinting

gnomico) era peculiare di ciascun sito di campionamento di ogni area geografica. Gli stessi genotipi sono stati trovati in un transetto di 200 m; la distanza genomica risultava essere correlata significativamente e positivamente con la distanza geografica.

1.3.1 Influenza della copertura vegetale sullo sviluppo, l'attività e la diversità della comunità microbica del suolo

In questo lavoro particolare attenzione è stata dedicata alla valutazione dell'effetto della copertura vegetale sulla microflora edafica, in quanto probabilmente l'eterogeneità della copertura vegetale rappresenta probabilmente uno dei principali fattori che la influenza, poiché determina la qualità, la quantità e la distribuzione temporale e spaziale delle risorse trofiche per i decompositori; inoltre la copertura vegetale influenza la temperatura e l'umidità degli strati superficiali del suolo, che sono quelli in cui è maggiormente concentrata l'attività biologica.

La diversità della comunità vegetale può influenzare la comunità microbica del suolo in vari modi. Può, per esempio, incrementare la produttività primaria netta (NPP, Schmid et al., 2002), che a sua volta può determinare un incremento dell'input di carbonio al suolo, sia accelerando il turnover della biomassa vegetale che incrementando l'essudazione radicale, e può in tal modo influenzare le comunità edafiche, che sono limitate dalle risorse di carbonio (Niklaus et al., 2003; Zac et al., 2003). Tale effetto della NPP sulla biomassa microbica può essere positivo (Myrold et al., 1989; Insam et al., 1991; Zac et al., 1994, 2003) o no (Groffman et al., 1996). Un'elevata diversità vegetale può comportare inoltre la presenza di una lettiera ampiamente diversificata, che a sua volta determina una maggiore diversità di decompositori e detritivori (Sulkava e Huhta, 1998; Hansen, 2000). Nei suoli forestali è stata rilevata la presenza di funghi che decompongono in maniera selettiva la lettiera di determinate specie vegetali (Widden, 1986); ciò implica che più la lettiera è diversificata, maggiore è la diversità fungina. Bardgett (2002) ha osservato che la presenza simultanea di lettieri diverse comporta una maggiore varietà delle risorse disponibili ed una maggiore complessità degli habitat, determinando una più elevata diversità delle comunità microbiche.

L'abbondanza, l'attività e la composizione delle comunità di decompositori potrebbe variare notevolmente in funzione non solo delle differenti specie vegetali (Bardgett et al., 1998; Wardle et al., 1999), ma anche di specifici gruppi funzionali vegetali; i legumi, ad

esempio, possono influenzare positivamente la biomassa microbica, migliorando la qualità della lettiera, cioè producendo lettiere con un basso rapporto C/N (Spehn et al., 2000; Scherer-Lorenzen et al., 2003).

Zac et al. (2003) hanno osservato, in un esperimento condotto su suoli di prateria in Minnesota, che più elevati sono i livelli di diversità nella copertura vegetale, più alto è il tasso di mineralizzazione dell'azoto e che l'accresciuta biomassa vegetale comporta un incremento della biomassa microbica e fungina.

La presenza di piante, oltre a fornire un input supplementare di materia organica al suolo, dà luogo alla formazione di nuovi habitat, la rizosfera e il rizopiano (Fig. 1.3).

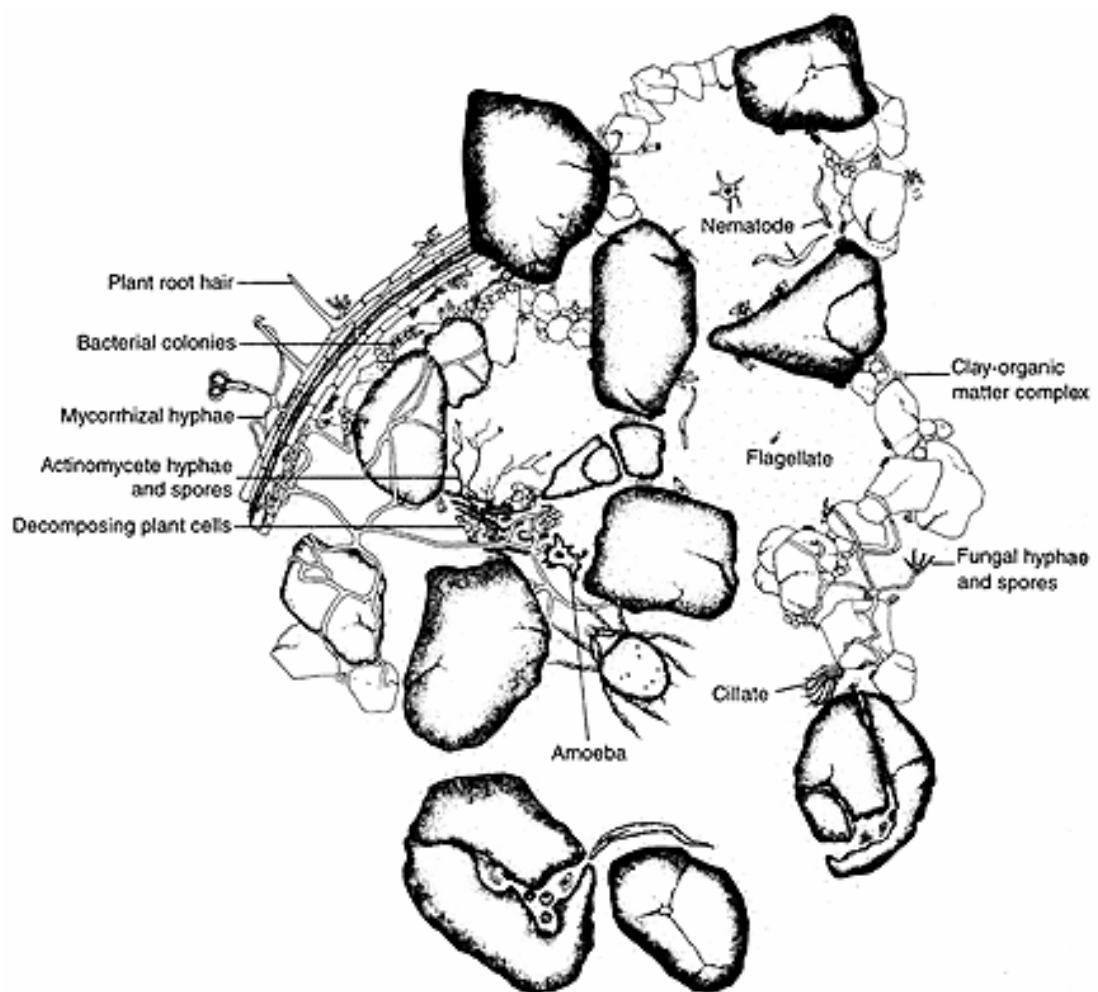


Fig. 1.3 - Associazione del biota del suolo con la radice di una pianta erbacea (Da Paul e Clark, 1996).

La maggiore complessità ed attività metabolica del sistema radicale (Foster, 1988) condiziona le caratteristiche della microflora del suolo circostante. Il numero di batteri aumenta notevolmente man mano che ci si avvicina alla rizosfera (Tabella 1.1).

Distanza dalla superficie radicale (mm)	Presenza di batteri (10^9 cellule cm^{-3})	Numero di tipi morfologicamente diversi
0-1	120	11
1-5	96	12
5-10	41	5
10-15	34	2
15-20	13	2

Tabella 1.1 - Numero di batteri in funzione della distanza dalla superficie radicale (Da Paul e Clark, 1996).

La rizosfera ospita una grande varietà di specie batteriche, con prevalenza di batteri G- (*Pseudomonas*, *Achromobacter*) e denitrificanti, rispetto a batteri G+ o forme batteriche G- variabili (*Bacillus*, *Arthrobacter*).

Inoltre le diverse specie vegetali possono regolare lo sviluppo di rizobatteri tramite il rilascio di specifici zuccheri ed amminoacidi nella zona radicale (Burr e Caesar, 1984; Kowalchuck et al., 2002). Quindi una più elevata diversità vegetale può produrre una maggiore diversità biochimica di essudati radicali e quindi selezionare per comunità microbiche più diversificate (Lavelle et al., 1995).

1.4 METODI DI STUDIO DELLE COMUNITA' MICROBICHE

1.4.1 Diversità della comunità microbica

Le conoscenze sulla diversità dei microrganismi edafici e sulle sue molteplici e complesse relazioni con le funzioni del suolo sono tuttora limitate, a causa delle difficoltà tecniche nella determinazione della diversità dei microrganismi del suolo ed alla mancanza di tecniche per valutare il contributo delle differenti componenti della comunità microbica del suolo alla struttura dell'ecosistema (Punkhurst et al., 1996). La non coltivabilità della maggior parte dei microrganismi del suolo è ormai ampiamente riconosciuta (Wagner et al., 1993); si ritiene che meno dell'1% delle specie microbiche presenti nel suolo siano coltivabili in vitro (Fægri et al., 1977; Domsch et al., 1979; Gray, 1990; Torsvik e Øvreås, 2002).

Negli ultimi anni sono state pertanto sviluppate tecniche che consentono di studiare le comunità microbiche nel loro insieme, senza isolare e identificare le singole specie. Tali tecniche possono essere distinte in due gruppi: il primo gruppo comprende le tecniche che si basano su un approccio di tipo fisiologico o funzionale, ossia il metodo Biolog[®] ed il metodo del profilo di risposta catabolica di Degens e collaboratori (2000), che consentono di determinare la diversità funzionale della comunità microbica; il secondo gruppo include invece le tecniche che utilizzano un approccio di tipo strutturale e che comprende vari metodi molecolari, per la determinazione della diversità genetica, ed il metodo del profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PFLA), che consente di distinguere le comunità microbiche sulla base della composizione in acidi grassi dei fosfolipidi di membrana.

Singolarmente nessuna di esse riesce a fornire una misura completa della biodiversità della microflora edafica (Paul et al., 1999); l'utilizzo combinato di più metodi, insieme alla determinazione di alcuni indicatori ampiamente utilizzati nel campo dell'ecologia microbica (attività e biomassa microbica) e indici (quoziente microbico, coefficiente di mineralizzazione endogena), può fornire una più completa caratterizzazione biologica del suolo (Widmer et al., 2001).

1.4.1.1 Tecniche per la determinazione della diversità funzionale della comunità edafica

Al pari della diversità di specie, la diversità funzionale include sia la varietà di funzioni (richness) che la distribuzione dell'attività microbica tra le funzioni totali (evenness). La comunità microbica svolge un elevatissimo numero di funzioni, quali la decomposizione della sostanza organica morta, la trasformazione dei nutrienti, la fissazione dell'azoto atmosferico, la formazione delle micorrize che migliorano l'assorbimento dei nutrienti da parte delle radici di molte specie vegetali, la produzione di sostanze biologicamente attive che stimolano la crescita delle piante, il miglioramento della qualità chimico-fisica del suolo attraverso la sintesi di molecole umiche, la stabilizzazione degli aggregati e vari processi fisici del suolo direttamente influenzati dai microrganismi (Giller et al., 1997). E' quindi difficoltoso misurare tutte le attività e per questo si ricorre invece alla misura della equiripartizione dell'attività microbica tra varie attività semplici nell'ambito di un numero definito di attività cataboliche (Degens et al., 2000).

Il sistema messo a punto dalla Biolog Inc. (Haywood, California, USA) consiste nell'utilizzo di micropiastre con 96 pozzetti, di cui 95 contenenti differenti substrati carboniosi e sali di tetrazolio ed uno privo di substrato utilizzato come controllo (Mills, 1991). Sospensioni di suolo vengono incubate in tali piastre in un intervallo di 24-48 ore. L'assorbanza misurata allo spettrofotometro fornisce la misura della riduzione dei sali di tetrazolio, dovuta all'attività catabolica dei microrganismi, in risposta a ciascun substrato. Tale metodo presenta tuttavia gli stessi limiti dei metodi colturali, poiché consente di misurare l'attività catabolica degli organismi in grado di crescere nelle condizioni di incubazione e quindi i risultati ottenuti potrebbero non riflettere la reale struttura funzionale della comunità edafica. Inoltre questo metodo considera soltanto l'attività batterica poiché i sali di tetrazolio sono tossici per i funghi (Zac et al., 1994).

Il metodo alternativo proposto da Degens e Harris (1997) è una variante del metodo SIR (Substrate Induced Respiration, Anderson e Domsch, 1978) e prevede la misura dell'incremento di respirazione (misurata come evoluzione di CO₂) indotto da un gruppo di substrati organici nel breve termine (4 ore). Tale metodo si basa sul principio che specie differenti hanno differenti capacità di metabolizzare un gruppo di substrati semplici (zuccheri, amminoacidi, acidi carbossilici). Pertanto il profilo delle risposte cataboliche dovute all'aggiunta di tale gruppo di substrati costituisce l'impronta catabolica che caratterizza una data comunità microbica. La equiripartizione delle diverse attività

cataboliche nell'ambito delle attività considerate invece fornisce informazioni sulla diversità funzionale, in termini di "catabolic evenness". Questo metodo consente di superare i limiti legati alla precedente metodica, in quanto non richiede l'utilizzo di procedimenti di estrazione, isolamento e coltivazione; i substrati vengono infatti aggiunti direttamente al suolo e l'attività catabolica misurata riflette le potenzialità degradative dell'intera comunità microbica. Degens et al. (2000) hanno ridotto il numero di substrati da 83, utilizzati inizialmente (Degens e Harris, 1997) a 25, scegliendo soltanto quelli che consentivano di ottenere una maggiore discriminazione tra suoli diversi, come messo in evidenza da Degens e Harris (1997) e Degens 1998. La diversità funzionale, valutata con questo metodo, fornisce informazioni sulla stabilità della comunità microbica rispetto a fattori di stress o disturbo. Infatti, inducendo in laboratorio condizioni di stress (riduzione di pH, incremento di salinità e di contenuto in metalli pesanti) o di disturbo (alternanza di condizioni di essiccamento-reidratazione, o di congelamento e scongelamento), Degens e collaboratori (2001) hanno osservato variazioni di diversità funzionale maggiori nei suoli coltivati, dove la diversità funzionale era in partenza più bassa, che nei suoli soggetti a pascolo, dove la diversità funzionale risultava inizialmente più elevata.

1.4.1.2 Tecniche molecolari per la valutazione della diversità genetica della comunità edafica

L'impiego di tecniche molecolari ha consentito di ottenere informazioni sulla struttura della comunità microbica, in termini di diversità genetica, superando il problema della conta su piastra. I metodi molecolari basati sull'analisi del DNA estratto dal suolo hanno rivelato una diversità microbica inattesa nel suolo (Torsvik et al., 1990; Insam, 2000; Nannipieri et al., 2003), ed in particolare essi hanno rivelato la presenza di circa 6000 genomi diversi per grammo di suolo (Torsvik et al., 1996). Tali metodi si basano sulla riassociazione delle catene di DNA o sulla determinazione del contenuto in guanina + citosina del DNA. Alcuni geni, definiti orologi molecolari, vengono utilizzati per stabilire la relazione filogenetica tra gli organismi del suolo e i principali regni del mondo biologico (Miller, 1998; Pietramellara et al., 2002, a). I geni più idonei sono quelli ribosomiali in particolare quelli del rDNA 16S (Pace et al., 1986; Head et al., 1998; O'Donnel et al., 1999) (Fig. 3) e 23S (Brim et al., 1999), nonché gli spaziatori ribosomiali trascritti (*ITS*, *Intergenic Transcribed Spacers*) tra l'rDNA 16S e 23S (De Oliveira et al., 1999;

Daffonchio et al., 2003). Questi geni presentano tratti di sequenze altamente conservate (universali) ed altre sequenze che variano in base alla specie microbica (Woese et al., 1987; Ludwig and Schleifer, 1994; Brim et al., 1999; Amann et al., 1995).

L'amplificazione, attraverso la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), il sequenziamento e la comparazione di questi geni con quelli di microrganismi noti, depositati nelle banche dati, permette la caratterizzazione della comunità microbica (White et al., 1990; Daffonchio, 2001). Occorre precisare che tali metodologie non permettono la completa determinazione della diversità di una comunità microbica, perché presentano una serie di limitazioni, quali l'inibizione dell'enzima che amplifica il DNA (Taq polimerasi) da parte degli acidi umici. Tuttavia, l'informazione generale ottenibile risulta molto più ampia ed approfondita di quella ottenibile con le tecniche tradizionali, focalizzate sulla misura della biomassa, dei processi di respirazione, sulle attività enzimatiche, sul numero di batteri coltivabili (Nannipieri et al., 2003).

Tra gli studi di ecologia molecolare, si possono distinguere principalmente due tipi di approcci. Uno prevede la costruzione di una libreria genica della sequenza scelta ed il successivo sequenziamento (White et al., 1990); invece il secondo fornisce l'impronta molecolare (*fingerprinting genetico*), separando frammenti di DNA con caratteristiche diverse. Tra i metodi che usano il secondo approccio, particolarmente utilizzati sono l'elettroforesi su gradiente di gel denaturante (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE), l'analisi di restrizione del 16S rDNA amplificato (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA), l'elettroforesi in gradiente di temperatura (Temperature Gradient Gel Electrophoresis, TGGE), l'analisi di polimorfismo elettroforetico di DNA a singola elica (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP) che generalmente sono condotti su porzioni amplificate dei geni ribosomiali (16S, 18S, 23S, *ITS*), che permettono di discriminare tra comunità microbiche diverse e mettono in evidenza eventuali variazioni genetiche di una comunità soggetta a diversi trattamenti (Heuer and Smalla, 1997; Heuer et al., 1997; Daffonchio et al., 1998; Muyzer and Smalla, 1998; De Oliveira et al., 1999; Smalla et al., 2001; Wenderoth et al., 2001; Renella et al., 2003, b; Abbate et al., 2003; Agnelli et al., 2004; Ricci et al., 2003). Le metodologie basate sul *fingerprinting genetico* permettono inoltre di effettuare studi analitici delle comunità, attraverso il sequenziamento del DNA purificato delle singole bande separate (Nakatsu et al., 2000).

Una evoluzione recente nell'ecologia molecolare basata sulla DGGE prevede l'utilizzo di *primers* specifici per l'amplificazione del 16S rDNA di specifici gruppi microbici. La susseguente separazione dei frammenti generati mediante PCR con *primers* specifici su gel

a gradiente denaturante (DGGE/TGGE) offre la possibilità di monitorare la struttura e la dinamica di popolazioni microbiche in funzione del tempo e dei cambiamenti ambientali (Broon et al., 2001). Tali tecniche possono essere utilizzate per caratterizzare gruppi microbici specifici che svolgono ruoli cruciali nell'ecosistema suolo, come ad esempio le cosiddette *key-stone species*, quali batteri metanotrofi appartenenti ai proteobatteri (Henckel et al., 1999; Boon et al., 2001), attinomiceti (Heuer et al., 1997, Gomes et al., 2001), batteri ammonioossidanti (Castaldini et al., 1998; Kowalchuk et al., 1998), archaea (Øvreås et al., 1997), acidobatteri (Boon et al., 2002) e funghi (Smit et al., 1999). Le tecniche qualitative, quali la DGGE con *primer* specifici, possono essere combinate con tecniche quantitative, quali la PCR quantitativa in tempo reale (*Real Time-PCR*), in modo da ottenere un mezzo potente per l'analisi qualitativa e quantitativa della comunità microbica (Amann and Ludwig, 2000; Boon et al., 2000, Ceccherini et al., 2003). Un'altra recente strategia per "aprire la *black box* della diversità microbica del suolo" (Tiedje et al., 1999) è quella che prevede l'amplificazione dell'intero genoma mediante PCR (*whole genome PCR – amplification*) per replicare successivamente regioni del genoma d'interesse biologico (Trevor et al., 2002). Lavori recenti suggeriscono che l'intero genoma possa essere replicato senza errori di trascrizione ed appaiamento (*bias*) (Trevor et al., 2002).

Le tecniche molecolari oggi utilizzate per studiare le comunità microbiche del suolo inizialmente venivano utilizzate per la ricerca medica e solo successivamente sono state applicate allo studio della comunità microbica del suolo. Data la complessità del suolo, dovuta alla presenza di componenti inorganici ed organici, i problemi metodologici da risolvere sono stati molteplici (Ceccherini et al., 2000; Nakatsu et al., 2000). La prima difficoltà è quella della scelta del metodo di campionamento che condiziona l'intero esperimento. Risultati validi possono essere ottenuti se la quantità di suolo prelevata è rappresentativa dell'intero suolo (O'Donnel e Görres, 1999; Ellingsøe e Johnsen, 2003; Nannipieri et al., 2003; Pietramellara et al., 2002, a). Poi occorre manipolare il campione in modo da non alterare la composizione della microflora. Infine occorre procedere all'estrazione del DNA, che costituisce una fase particolarmente critica della tecnica molecolare. Durante l'estrazione del DNA si può avere infatti la coestrazione di sostanze organiche (acidi umici, acidi fulvici, detriti cellulari, polisaccaridi, proteine, solventi organici) ed inorganiche (xenobiotici, metalli pesanti, minerali argillosi), che possono contaminare il campione, compromettendo le successive fasi analitiche. Ad esempio, alcuni dei contaminanti (sostanze umiche) possono inibire la polimerasi, l'enzima chiave della PCR (Porteous e Armstrong, 1991; Tsai e Olson, 1992; Tebbe e Vahjen, 1993;

Vettori et al., 1996; Liesack et al., 1997; Chandler et al., 2000; Kozdròj e Van Elsas, 2000). La DNA polimerasi è inibita mediamente da 1µl di acidi umici e tale inibizione è indipendente dalla quantità di DNA (Tsai e Olson, 1992). Tebbe e Vahjen (1993) hanno visto che 0,08 µg/ml di acidi umici inibiscono la *Taq* polimerasi, mentre 0,5-1,17 µg/ml inibiscono gli enzimi di restrizione. Le sostanze umiche coestratte con il DNA sono difficili da rimuovere senza trattamenti laboriosi (Trevors e Van Elsas, 1989; Romanowski et al., 1992). Anche i minerali argillosi inibiscono la *Taq* polimerasi (Vettori et al., 1999). Inoltre, Nannipieri et al. (1986) hanno documentato l'interferenza degli acidi umici nella determinazione colorimetrica degli acidi nucleici e MacGregor et al. (2002) hanno evidenziato il loro effetto inibitore sulla ibridizzazione del DNA di *E. coli* con quello di *Bact 338*. Esistono numerosi protocolli per la purificazione del DNA. Tali protocolli utilizzano trattamenti con polyvinylpolypyrrolidone (PVPP; Zhou et al., 1995; Frostegård et al., 1999), bromuro di esadeciltrimetil-ammonio (CTAB; Malik et al., 1994; Zhou et al., 1995) o colonne di idrossiapatite (Torsvik, 1980) e possono basarsi su centrifugazioni in cloruro di cesio a differenziate densità (Ogram et al., 1987; Holben et al., 1988; Walia et al., 1990; Lovell e Piceno, 1994; Leff et al., 1995) oppure su cromatografia a scambio ionico o ad esclusione molecolare (Erb e Wagner-Dobler, 1993; Leff et al., 1995; Kuske et al., 1998; Hurt et al., 2001), o ancora su elettroforesi su gel d'agarosio, seguita dalla separazione delle bande e successiva purificazione del DNA da gel (Malik et al., 1994; Zhou et al., 1995). Il rischio della purificazione è quello di alterare o perdere il DNA (Amsaleg-Roose et al., 2002). Recenti studi molecolari hanno mostrato l'influenza di vari fattori, quali il metodo di estrazione del DNA, il tipo di lisi cellulare, il metodo di purificazione ed il grado di diluizione del DNA, sulle analisi di DGGE-*fingerprinting genetici* (Heuer e Smalla, 1997; Kozdrój e Van Elsas, 2000; Li et al., 2003).

Molta attenzione deve essere posta nell'uso dei *primer* quando si vogliono studiare le popolazioni microbiche. Ad esempio, utilizzando *primer* generici od universali, i profili di DGGE mostreranno le specie microbiche più rappresentate nel campione in esame. Le variazioni a carico di microrganismi meno rappresentativi potrebbero non essere visibili nei profili (Heuer e Smalla, 1997; Muyzer e Smalla, 1998; Lottmann et al., 2000). Tutto questo va preso in considerazione quando si procede all'interpretazione dei risultati di un *fingerprinting* dopo la DGGE.

Sebbene queste tecniche contribuiscano notevolmente a risolvere la complessità delle comunità microbiche, esse danno un'immagine descrittiva della comunità e non permettono da sole di stabilire la relazione tra diversità dei microrganismi e funzionalità

del suolo. A questo scopo sono state sviluppate tecniche che prevedono l'estrazione dell'RNA messaggero dal campione suolo (Daffonchio, 2001). In tal modo è possibile quantificare l'espressione di geni funzionali che codificano per prodotti metabolici specifici, rendendo possibile la correlazione tra la diversità e la funzionalità di determinati gruppi microbici. Tale approccio però è limitato dal basso grado di conservazione dell'mRNA suolo e soprattutto dalla complessità del suolo (Daffonchio, 2001; MacGregor et al., 2002).

Una strategia particolarmente interessante si basa sulla cattura specifica (*immuno capture*) di DNA di cellule che hanno risposto ad un determinato stimolo, ad esempio che sono cresciute utilizzando un determinato substrato (Bornemann, 1999). Il DNA catturato può essere analizzato attraverso le tecniche di *fingerprinting* dei geni ribosomiali. La comparazione di tale *fingerprinting* con quello della comunità totale non sottoposta allo stimolo ed il sequenziamento delle bande differenziali permettono di individuare i microrganismi che svolgono una determinata funzione all'interno della comunità microbica.

1.4.1.3 Determinazione del profilo degli acidi grassi per la stima della diversità strutturale della microflora edafica

L'estrazione e la determinazione cromatografica degli acidi grassi dei fosfolipidi (PFLA) presenti nelle membrane cellulari dei microrganismi fornisce il profilo degli acidi grassi, che consente di caratterizzare la comunità microbica dal punto di vista strutturale (Bååth et al., 1992; Frostegård et al., 1993). I fosfolipidi sono i principali costituenti delle membrane plasmatiche, sono associati esclusivamente a cellule di microrganismi viventi (Tate III & Rogers, 2002) ed hanno solo un ruolo strutturale, poiché non si accumulano nelle cellule come materiale di riserva. Gli acidi grassi vengono rapidamente decomposti ad opera degli enzimi idrolitici, dopo la morte della cellula.

La composizione in acidi grassi dei fosfolipidi differisce tra gruppi di microrganismi e quindi può essere utilizzata come un indicatore della variazione della struttura e della diversità delle comunità microbiche in risposta a cambiamenti delle condizioni ambientali (Bååth et al., 1998). La variabilità, fra organismi diversi, del contenuto in fosfolipidi nelle membrane cellulari e la loro quantità in relazione alla massa cellulare totale non sono, però, così marcate quanto quelle di altri costituenti cellulari, quali l'ATP (Nannipieri,

1993). Gli acidi grassi si differenziano per la loro dimensione molecolare, per il grado e il sito di attacco e il numero e il sito dei doppi legami. E' per questo motivo che essi sono stati impiegati ai fini tassonomici (Lechevalier, 1977; Weete, 1980). Alcuni acidi grassi sono presenti in un numero limitato di microrganismi. Ad esempio l'acido tuberculostearico (10Me18:0) è presente soltanto negli attinomiceti (Kroppenstedt, 1985), mentre il 18:2 omega 6 è il principale acido grasso rilevato nei funghi del suolo e rappresenta un indicatore di biomassa fungina (Bardgett et al., 1997).

1.4.2 Biomassa microbica

La biomassa microbica è stata definita come la frazione vivente della sostanza organica del suolo, escludendo le radici delle piante e la pedofauna (Jenkinson e Ladd, 1981). La quantità di biomassa microbica nel suolo rispecchia generalmente il contenuto di sostanza organica, con un rapporto carbonio microbico/carbonio organico compreso in media tra 1 e 5 % in peso (Sparling, 1985).

La biomassa microbica non è strettamente correlata all'attività della microflora edafica poiché comprende anche le cellule dormienti, che spesso ne costituiscono la frazione più cospicua. Elevati valori di biomassa microbica indicano l'esistenza di condizioni, attuali o pregresse, favorevoli allo sviluppo dei microrganismi (Florenzano, 1989).

La biomassa microbica ha un turnover più veloce rispetto alla sostanza organica del suolo e risponde rapidamente alle variazioni dei fattori ambientali, quindi può essere considerata un sensibile indicatore degli effetti delle variazioni dei diversi parametri ambientali sulle caratteristiche della microflora edafica (Rice et al., 1996). Essa in genere viene determinata mediante metodi biochimici (Nannipieri, 1993; Sparling & Ross, 1993; Martens, 1995), tra i quali particolarmente utilizzati in letteratura sono i metodi di fumigazione-incubazione (FI, Jenkinson & Powlson, 1976; Jenkinson & Ladd, 1981), fumigazione-estrazione (FE, Vance *et al.*, 1987; Joergensen & Brookes, 1990) e respirazione indotta da substrato (SIR; Anderson & Domsch, 1978; Sparling & Ross, 1993).

Il metodo della SIR è basato sull'assunto che suoli differenti, messi nelle stesse condizioni di umidità e temperatura, arricchiti con una stessa quantità di substrato organico, prontamente mineralizzabile e fornito in eccesso, raggiungono il massimo tasso di attività respiratoria. Poiché le risposte respiratorie ottenute in questo modo sono risultate diverse da suolo a suolo, ma pressoché costanti tra repliche di uno stesso suolo, è stato ipotizzato

che in tali condizioni di incubazione l'attività respiratoria indotta dall'aggiunta di substrato sia direttamente correlata alla quantità di microflora edafica attiva presente.

1.4.3 Attività microbica

L'attività microbica viene determinata come respirazione del suolo (evoluzione di CO₂ dal suolo), che costituisce un indicatore del livello di attività di decomposizione della materia organica operata dai microrganismi edafici (Anderson, 1982; Insam, 1990).

La respirazione è sensibile a numerosi fattori ambientali, tra i quali la temperatura, l'umidità, la disponibilità di sostanza organica nel suolo (Brookes, 1995), ed infatti è un parametro ampiamente utilizzato per valutare l'influenza delle variazioni delle condizioni ambientali sui processi di ossidazione della sostanza organica (Nannipieri et al., 1990).

La respirazione del suolo può essere determinata in campo ed in laboratorio. La respirazione misurata in campo include oltre all'attività dei microrganismi e della pedofauna, anche quella delle radici delle piante. In laboratorio la respirazione generalmente si misura su suolo setacciato (maglie del setaccio: 2mm), in modo da escludere le radici delle piante e la pedofauna di maggiori dimensioni, e in condizioni standard di temperatura e tenore idrico del suolo.

Dalla respirazione del suolo è possibile calcolare interessanti indici del metabolismo microbico, quali il quoziente metabolico e il coefficiente di mineralizzazione endogena.

Il quoziente metabolico (qCO₂) rappresenta il tasso di respirazione per unità di biomassa microbica ed unità di tempo ($qCO_2 = mg\ C_{CO_2}\ mg^{-1}\ C_{mic}\ gg^{-1}$; Anderson & Domsch, 1993). Secondo la teoria di Odum (1969) sulla strategia di sviluppo degli ecosistemi, il tasso di respirazione per unità di biomassa si riduce, all'interno di un ecosistema, nel corso di una successione, in quanto il sistema tende ad ottimizzare l'uso delle risorse energetiche disponibili. In un sistema giovane c'è una minore competizione per accedere alle risorse e gli organismi presentano una più bassa efficienza di utilizzazione delle risorse. Quando l'ecosistema evolve verso stadi più maturi, c'è una maggiore competizione per le risorse e la pressione selettiva favorisce gli individui che utilizzano le risorse con maggiore efficienza (Insam & Haselwandter, 1989). Il quoziente metabolico rappresenta una sintesi di questo concetto ed è stato applicato alle comunità microbiche del suolo; una riduzione del quoziente metabolico indica un miglioramento dell'efficienza di utilizzazione delle risorse da parte dei microrganismi (Insam & Haselwandter, 1989), mentre il suo aumento indica l'instaurarsi di condizioni di stress, poiché le cellule tendono in tal caso a consumare

più energia per riparare i sistemi cellulari danneggiati (Anderson e Domsch, 1993). Inoltre in condizioni di stress i microrganismi consumano una quantità maggiore di energia per il mantenimento (Odum, 1985).

Alcuni autori ritengono che il quoziente metabolico sia più sensibile ai cambiamenti ambientali rispetto sia alla respirazione che alla biomassa microbica (Anderson e Domsch, 1986).

Il coefficiente di mineralizzazione endogena ($CEM = mg\ C_{CO_2}\ g^{-1}\ C_{org}\ gg^{-1}$) rappresenta la frazione di carbonio organico che viene mineralizzata a CO_2 nell'unità di tempo. Questo indice può fornire interessanti informazioni sul tasso di mineralizzazione della sostanza organica e sulla capacità potenziale del suolo di accumulare o dissipare carbonio.

Il tasso di respirazione della comunità microbica del suolo dipende dalle condizioni fisiche (umidità e temperatura) e chimiche (contenuto di sostanza organica) del suolo. In condizioni standard di laboratorio, non limitanti per i microrganismi, valori più elevati di respirazione, non associati ad un incremento di pari grado del contenuto di carbonio organico, si traducono in valori più elevati di CEM. Questo fenomeno potrebbe essere correlato all'instaurarsi di condizioni sfavorevoli per la comunità microbica. Infatti in condizioni di stress i microrganismi consumano una quantità maggiore di energia per il mantenimento (Odum, 1985) e quindi dissipano una maggiore frazione di carbonio organico.

Rutigliano e collaboratori (2002 b) hanno rilevato incrementi del valore di CEM in suoli soggetti ad incendi accidentali in un'area a macchia mediterranea mista a pini e in suoli soggetti ad incendi sperimentali in pratelli di macchia, rispettivamente per circa 120 e 350 giorni dopo il passaggio del fuoco. Gijsman e collaboratori (1997), studiando suoli di una savana columbiana sottoposti ad una monocoltura di riso oppure ad una rotazione tra coltura di riso e prato da pascolo, hanno riscontrato un incremento del CEM nei suoli sottoposti a rotazione, in particolare in presenza di prati dominati da leguminose, rispetto ai suoli sottoposti a monocoltura.

1.5 L'AMBIENTE MEDITERRANEO

Lo studio sulla relazione tra comunità microbica del suolo e copertura vegetale è stato effettuato, in questa tesi, in ambiente mediterraneo, in quanto tale ambiente si presenta estremamente diversificato in termini di copertura vegetale, principalmente per effetto del ricorrente disturbo antropico.

1.5.1 Diversità in ambiente mediterraneo

Nel bioma mediterraneo sono state identificate 48250 specie di piante, circa il 20% delle specie totali del pianeta (Cowling et al., 1996), la maggior parte delle quali si trova nel bacino del mar Mediterraneo, in accordo con la maggior estensione dell'area, della elevata eterogeneità topografica e climatica (Tab 1.2). Nel bacino del Mediterraneo, infatti, sono state identificate 25.000 specie di piante, di cui più della metà sono endemiche e alcune delle quali sono a carattere puntiforme.

Regione	Area (10 ⁶ Km ²)	Specie di piante autoctone	Eterogeneità topografica	Eterogeneità climatica
Bacino del Mediterraneo	2,30	25000	Alta	Molto alta
California	0,32	4300	Alta	Molto alta
Cile centrale	0,14	2400	Molto alta	Molto alta
Regione del Capo, Sud- Africa	0,09	8550	Moderata	Alta
Australia Sud-Ovest	0,31	8000	Bassa	Moderata

Tab. 1.2 - Diversità di specie di piante, diversità topografica e climatica nelle regioni climatiche-mediterranee del mondo (Cowling et al., 1996, modificata).

Il particolare clima presente negli ecosistemi di tipo mediterraneo ha determinato l'evoluzione di una peculiare vegetazione costituita da alberi ed arbusti sempreverdi con accentuata sclerofillia, che consiste nella presenza di sclerofille, cioè foglie rigide,

resistenti alla siccità e alla decomposizione. Mentre gli alberi e gli arbusti sclerofilli tollerano l'aridità, le piante erbacee di ambiente mediterraneo sopravvivono alla stagione arida attuando una strategia di evitanza: nelle piante erbacee perenni in estate muore la parte epigea e sopravvive solo la porzione ipogea, dalla quale in inverno o in primavera si sviluppa la biomassa aerea; le piante erbacee annuali invece si riproducono alla fine dell'inverno o in primavera, in estate muoiono lasciando solo il seme (Venturelli e Virli, 1995).

L'elevata diversità di specie vegetali nel bacino del mar Mediterraneo è legata alla coesistenza di aree a diverso stadio successionale, principalmente la lecceta, la macchia mediterranea e la gariga. La lecceta o foresta sempreverde costituisce lo stadio maturo della successione ecologica in queste condizioni climatiche e presenta una struttura molto complessa costituita da più strati. Nello strato arboreo predomina il leccio, ma troviamo anche la roverella (*Quercus pubescens* Willd.), l'acero (*Acer monspessolanum* L.) e il frassino (*Fraxinus ornus* L.). Lo strato arbustivo è, invece, costituito in prevalenza dal corbezzolo (*Arbutus unedo* L.), dalla fillirea (*Phyllirea latifolia* L.), dall'alaterno (*Rhamnus alaternus* L.) e dal viburno (*Viburnum tinus* L.). Il sottobosco è costituito da arbusti bassi (*Ruscus aculeatus* L., *Rosa sempervirens* L., etc.) e da un ridottissimo strato erbaceo. In questo tipo di ambiente si osserva anche la caratteristica presenza di liane, quali *Smilax aspera* L., *Lonicera implexa* Aiton, *Rubia peregrina* L., *Clematis flammula* L. (Bullini et al., 1998). Attualmente si incontrano pochissimi boschi di leccio puro, ciò è dovuto in parte all'attività antropica (Mariotti, 1989), in parte ai terreni poco profondi (Mariotti, 1989). Nelle zone interne, i limiti allo sviluppo delle leccete sono imposti dalle condizioni climatiche.

Nelle zone prossime al litorale, per effetto degli incendi, dei disboscamenti e del pascolo, la lecceta può degradare nella macchia, che è costituita da arbusti che tendono a formare uno strato compatto alto in genere 4-6 m. Le specie arboree tipiche di questo ambiente sono il leccio (*Quercus ilex* L.), il carrubo (*Ceratonia siliqua* L.), l'olivo (*Olea europea* L.) e talvolta compaiono individui di pino domestico (*Pinus pinea* L.), derivati da rimboschimenti (Pignatti, 1986). Le specie arbustive comprendono, oltre quelle già viste per la lecceta, il lentisco (*Pistacia lentiscus* L.), il terebinto (*Pistacia terebintus* L.), il cisto (*Cistus* sp.pl.), la fillirea (*Phyllirea latifolia* L.) e il mirto (*Myrtus communis* L.) (Torrent, 1995). Nelle forme più degradate o meno evolute la macchia include *Cistus* sp.pl., *Juniperus* sp.pl., *Rosmarinus officinalis* L., *Erica* sp.pl., *Lavandula* sp.pl. (Torrent, 1995). Uno stadio ulteriormente degradato è costituito dalla gariga caratterizzata dall'alternanza di bassi cespugli e di pratelli di erbe annuali (Bullini et al., 1998). Questo tipo di vegetazione

occupa i suoli con scarsa differenziazione in orizzonti, con pH generalmente alcalino e molto poveri di fosforo e azoto (Giovagnotti, 1989; Padula, 1985). La macchia non sempre è da considerarsi il risultato di una successione secondaria dopo il disturbo (Blasi et al., 1993), ossia non sempre costituisce uno stato di degradazione della lecceta, essa può invece rappresentare uno stadio della serie dinamica che porta alla formazione della lecceta. Laddove le caratteristiche edafiche e microclimatiche non consentono un'ulteriore evoluzione della vegetazione verso la lecceta, la macchia potrebbe essere considerata un climax edafico. Analogamente Piusi (1992) considera possibile l'ipotesi di un'origine primaria della macchia.

Alla elevata diversità vegetale corrisponde anche un'elevata diversità faunistica. Per esempio sono state riportate 184 specie di mammiferi terrestri, di cui 25% endemiche (Cheylan, 1991), 345 specie di uccelli in riproduzione, contro 419 specie che si riproducono in 10 milioni di km² dell'intera Europa (Voous, 1960), 179 specie di rettili, di cui il 62% endemiche, 62 specie di anfibi, di cui il 56% endemiche (Cheylan & Poitevin, 1993).

Oltre che da un'elevata diversità della comunità biotica, l'ambiente mediterraneo è caratterizzato anche da suoli molto differenti, che si sono sviluppati grazie alla grande varietà di condizioni litologiche, climatiche e biotiche. Aree di piccola estensione spesso includono tre o quattro (e occasionalmente, fino a 5 o 6) ordini di suoli. Degli undici ordini di suoli identificati dalla Soil Taxonomy, quattro (*Entisols*, *Inceptisols*, *Vertisols* e *Alfisols*) costituiscono circa il 90% della superficie coperta da suolo delle regioni mediterranee (Torrent, 1995). Altri tre ordini di suoli (*Mollisols*, *Aridisols* e *Ultisols*) si trovano meno frequentemente e possono essere localmente significativi. Dei rimanenti quattro ordini, tre (*Andisols*, *Histosols* e *Spodosols*) sono rari e gli *Oxisols* sono assenti (Torrent, 1995). Una tale varietà di suoli è dovuta alla posizione del bacino del Mediterraneo in un'area di transizione tra regioni temperate e subtropicali. In uno studio sulla diversità dei suoli, Ibáñez et al. (1992) hanno riportato che in Europa le regioni mediterranee sono le più diverse da un punto di vista pedologico. Per esempio la Spagna ha 18 delle 26 unità di suolo riportate nella classificazione FAO-UNESCO 1975, mentre, all'altro estremo, la Danimarca ne ha solo 7.

1.5.2 Fattori di disturbo nel bacino del mar Mediterraneo

Le peculiarità dell'ambiente mediterraneo sono state determinate anche dalla prolungata presenza dell'uomo in quest'area. Nel bacino del Mediterraneo il disturbo antropico (deforestazione, pascolo, agricoltura e gestione del fuoco) è cominciato 10.000 fa, con lo sviluppo dell'agricoltura. Sebbene i problemi di deforestazione ed erosione risalgano ai tempi dei Greci e dei Romani, molte delle pratiche usate in quell'epoca erano sostenibili. Molte delle prime forme di uso agro-pastorale delle foreste e degli arbusteti mediterranei continuarono senza significative modificazioni dell'ambiente fino alla metà del XX secolo (Caravello e Giacomini, 1993). Per esempio specie come *Quercus ilex* e *Q. pubescens* hanno dominato i boschi del sud della Francia e dell'Italia e sono stati sfruttati per secoli per la produzione di legna da ardere e la produzione di carbone. Nelle ultime 4 decadi si sono verificate invece drammatiche alterazioni ambientali. La conversione della stabile e diversificata agricoltura tradizionale in sistemi di agricoltura intensiva e allevamenti su larga scala, insieme all'indiscriminato impianto di monoculture di pini ed eucalipti, sono processi che hanno riguardato in generale tutto il bacino Mediterraneo (Naveh, 1998).

In molte aree del bacino del mar Mediterraneo si assiste a due situazioni antitetiche: da una parte vi sono terreni fertili di pianura con un'attività agricola fiorente, ma anche con i più consistenti insediamenti demografici, dall'altra vi sono i terreni marginali più poveri delle aree collinari e montane, dove l'agricoltura, come la popolazione vanno via via rarefacendosi. L'abbandono delle aree coltivate collinari e montane sta determinando la degradazione di insigni opere di sistemazione agraria, come i terrazzamenti, ancora scolpiti sulle pendici e nelle pianure di molte regioni, che si sono mantenute nei secoli solo con continui interventi di ripristino e manutenzione. L'abbandono delle aree coltivate collinari e montane, con l'incremento dell'urbanizzazione, ha anche portato all'incremento della frequenza e dell'estensione degli incendi. In ambiente mediterraneo il fuoco costituisce infatti una perturbazione ricorrente, che può avere una origine naturale, oltre che antropica. L'alternanza di periodi umidi, nei quali si accumula combustibile (biomassa e necromassa), e di periodi caldi e asciutti, durante i quali il combustibile si asciuga, divenendo più facilmente infiammabile, costituisce una condizione predisponente per l'insorgenza di incendi naturali, innescati principalmente da fulmini. Tuttavia nel bacino del Mediterraneo le attuali cause di incendio della vegetazione sono riconducibili principalmente all'attività antropica (Susmel, 1973). Infatti fin dal Neolitico l'uomo ha utilizzato il fuoco come strumento per gestire la vegetazione (Naveh e Dan, 1973; Singh et

al., 1981; Le Cöz, 1990) al fine di convertire ecosistemi naturali in agroecosistemi o in ecosistemi urbani o anche come supporto per alcune pratiche agro-silvo-pastorali.

Il fuoco rappresenta un fattore importante nella dinamica della vegetazione mediterranea, essendo una delle più comuni perturbazioni che distrugge la comunità biotica determinando l'avvio di una successione secondaria. Le formazioni arbustive del Mediterraneo, infatti, sono state da sempre soggette ad incendi ricorrenti (Naveh, 1975), spesso di origine antropica, che hanno concorso marcatamente a determinare le caratteristiche del paesaggio (Margaris, 1980). Dopo un incendio la biomassa epigea della vegetazione risulta quasi totalmente distrutta e la sopravvivenza delle specie adattate al fuoco è affidata ad organi sotterranei o alla riserva di semi conservati nel suolo.

In ambiente mediterraneo il fuoco favorisce la presenza di arbusteti e piante erbacee a scapito degli alberi. Infatti un'elevata frequenza degli incendi non consente alla vegetazione di raggiungere lo stadio maturo e può essere responsabile di accentuati fenomeni di erosione, con conseguente perdita di sostanza organica e nutrienti, al punto da non consentire lo sviluppo di una vegetazione arborea (Pignatti, 1995).

La moderna gestione del territorio favorisce i fenomeni di erosione, oltre che favorendo l'insorgenza di incendi, anche per effetto delle pratiche utilizzate nell'agricoltura intensiva, quali le lavorazioni del terreno a rittochino nelle aree ad elevata pendenza, l'utilizzo di macchine sempre più sofisticate che generano la formazione della suola d'aratura (zona compatta d'interfaccia fra lo strato arato e il suolo naturale) e l'eccessivo amminutamento superficiale del suolo per la preparazione dei letti di semina. A ciò si aggiunge la perdita di opere mirate alla conservazione dei suoli quali le sistemazioni idraulico-agrarie, i drenaggi, gli inerbimenti.

Un altro fattore di disturbo che ha interessato l'ambiente mediterraneo sin dall'antichità è il pascolo. Il pascolo comporta la rimozione della materia organica che, in parte, è compensata dalla restituzione di elementi nutritivi attraverso le deiezioni. Nonostante ciò alcuni ambienti risultano alterati dall'attività di pascolo in quanto tra gli animali esistono caratteristici comportamenti di deposizione delle deiezioni e delle urine, che portano al loro rilascio solo in determinate aree del territorio pascolato creando uno squilibrio nella ridistribuzione delle sostanze nutritive (Mcintosh, 1997). Inoltre il calpestio degli animali da pascolo comporta un aumento del compattamento del suolo, con conseguente riduzione della macroporosità e quindi della disponibilità di aria nel suolo. La riduzione di disponibilità di ossigeno può a sua volta inibire l'attività dei decompositori, con conseguente riduzione della disponibilità di nutrienti utili alle piante. Il compattamento del

suolo determina anche alterazioni a livello idrogeologico, aumentando il ruscellamento superficiale e quindi l'erosione del suolo. In tempi recenti, con l'agricoltura industrializzata, gli animali da pascolo sono tenuti in stalle, almeno per parte dell'anno, e sono nutriti con fieno provocando un impoverimento dei suoli, sia per effetto della rimozione della vegetazione per la produzione di fieno, sia a causa della mancata restituzione dei nutrienti con le deiezioni degli animali. Questo genera il paradosso degli agroecosistemi moderni: la mancata utilizzazione delle deiezioni animali da un lato genera inquinamento, dall'altro richiede l'uso di concimi minerali (Caporali, 1991). A fronte di una riduzione del numero di animali nell'azienda agricola, il numero totale di capi allevati è aumentato, per effetto della elevata disponibilità di cibo, garantita dall'uso di fieno. Nel caso che gli animali da pascolo vengano portati all'aperto in primavera e in estate, generalmente in aree poco estese, questi consumano in modo eccessivo le specie erbacee appetibili, lasciando che specie non appetibili diventino dominanti nella comunità. Il super-pascolo costituisce una delle principali cause di desertificazione, che secondo la Convenzione per combattere la siccità e la desertificazione (UNCCD) ratificata dalle Nazioni Unite nel 1994, consiste nella degradazione dei suoli nelle aree aride, semiaride, secche e subumide, come risultato di diversi fattori, tra i quali le variazioni climatiche e le attività antropiche. Essa comporta la riduzione della copertura di piante perenni, l'impoverimento della flora, l'erosione del suolo, la formazione di dune mobili e l'instaurarsi di una superficie desertica (Grove e Rackam, 1998).

Altro problema che ha interessato l'ambiente mediterraneo è la diminuzione significativa delle aree naturali o semi-naturali causata dall'urbanizzazione, che ha sottratto molti ettari di suolo alla vegetazione. Per esempio nella provincia di Napoli in 40 anni la superficie agricola si è ridotta del 31%, a causa dell'urbanizzazione (Fig. 1.4).

Infine il bacino del mar Mediterraneo è stato caratterizzato dall'introduzione di specie aliene, di cui molte invasive. In esso si trovano per esempio circa 250 specie invasive (1% della flora locale), molte meno che negli altri ambienti di tipo mediterraneo. Infatti il bacino del Mediterraneo ha dato ad altre regioni un maggior numero di specie invasive di quelle che ha ricevuto. Molte piante invasive del bacino del mar Mediterraneo sono erbacee. Queste, insieme alle poche specie invasive legnose (*Fraxinus ornus*, *Broussonetia papyifera* e *Robinia pseudo-acacia*), sono escluse da molti ambienti naturali eccetto le rive dei fiumi. Generalmente occupano invece ambienti disturbati, come fossati e margini di strade.

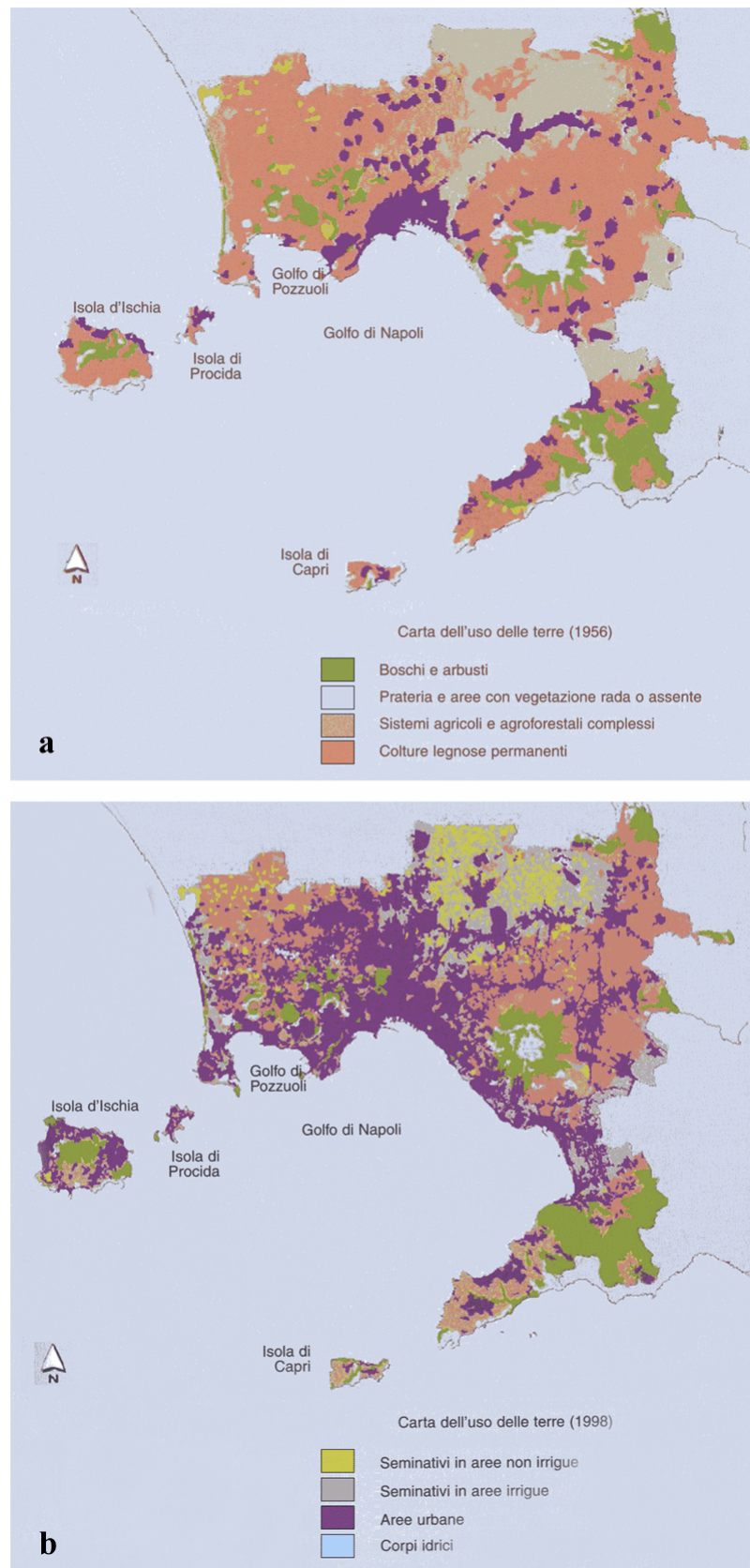


Fig. 1.4 - Confronto dell'uso del territorio nella provincia di Napoli tra il 1956 (a) e il 1998 (b) (Da di Gennaro, 2005).

CAPITOLO II

OBIETTIVO DELLA RICERCA

2.1 OBIETTIVO DELLA RICERCA

Una corretta gestione degli ecosistemi non può prescindere dalla conservazione di una buona funzionalità della comunità edafica, considerando l'importante ruolo che questa svolge negli ecosistemi terrestri. Recentemente si sta dedicando molta attenzione alla comunità edafica, in quanto il suo sviluppo e la sua attività possono dare indicazioni sullo stato di salute del suolo (Doran e Zeiss, 2000), laddove per stato di salute del suolo si intende la capacità del suolo di funzionare come sistema vivente in modo da sostenere la produttività primaria, garantire una buona qualità dell'acqua e dell'aria e promuovere la salute di piante e animali (Doran e Zeiss, 2000). Per questo negli studi mirati a definire l'impatto di fattori ecologici naturali ed antropici sul suolo vengono oggi impiegati come indicatori numerosi parametri microbici. In generale l'uso di indicatori biologici è di grande importanza in quanto fornisce informazioni circa lo stato di salute attuale di un ecosistema, ma mette in evidenza anche situazioni di stress pregresse.

La comunità edafica è caratterizzata da una grande diversità fenotipica e genotipica (Nüsslein and Tiedje, 1998; Torsvik et al., 1990, 1994 and 1996). Diverse specie microbiche sono presenti nel suolo e le loro abbondanze relative variano in relazione alle caratteristiche del suolo (Griffith et al., 1999; Ceccherini et al., 2000) e riflettono la pressione selettiva dell'ambiente. Nell'ambito della microflora edafica, ed in particolare per i batteri, è difficile distinguere le specie (Freckman, 1994) poichè la morfologia di numerosi organismi muta durante il ciclo vitale, rendendone più difficile il riconoscimento, mancano i metodi di estrazione di molti microrganismi e funghi e non sono ancora perfettamente sviluppate le tecniche colturali; inoltre l'attività e l'abbondanza dei microrganismi varia velocemente in risposta alle variazioni delle proprietà fisico-chimiche del suolo; infine l'enorme numero di specie e la varietà di microhabitat richiederebbero l'analisi di un enorme numero di campioni (Othonen et al., 1997). Le tecniche biomolecolari consentono oggi di superare in parte tale difficoltà. Piuttosto che determinare la diversità specifica, è possibile, tramite tecniche molecolari, determinare la diversità genetica della microflora edafica. La biodiversità, intesa come varietà di specie, ma anche come variabilità genetica all'interno di ciascuna specie (Øvreås and Torsvik, 1998), è considerata una caratteristica positiva dei sistemi naturali; essa risulta spesso diminuita, infatti, in seguito ad interventi antropici devastanti, o comunque alterata in ecosistemi in avanzato stato di declino (Smit et al., 1997; Stephen et al., 1999).

Ad una elevata diversità specifica o genetica non necessariamente corrisponde una maggiore funzionalità della microflora edafica (Van Veen e Heijnen, 1994). Per questo è interessante conoscere anche la diversità funzionale della microflora edafica e le sue variazioni al variare dei fattori ecologici. La diversità funzionale comprende sia la varietà di funzioni che la equiripartizione dell'attività microbica tra le diverse funzioni (Magurran, 1988). La comunità microbica svolge un elevatissimo numero di funzioni, quali la decomposizione, la trasformazione dei nutrienti, la fissazione dell'azoto atmosferico, la formazione delle micorrize, che migliorano l'assorbimento dei nutrienti da parte delle radici di molte specie vegetali, la produzione di sostanze biologicamente attive, che stimolano la crescita delle piante, la promozione della qualità chimico-fisica del suolo attraverso la sintesi di molecole umiche, la stabilizzazione degli aggregati e vari processi fisici del suolo direttamente influenzati dai microrganismi (Giller et al., 1997); è quindi difficoltoso misurare tutte le attività e per questo si ricorre invece alla misura della equiripartizione dell'attività microbica tra varie attività semplici nell'ambito delle attività cataboliche (Degens et al., 2000).

La microflora edafica può essere influenzata dalle variazioni dei fattori ambientali, quali i fattori climatici, in primo luogo temperatura e precipitazioni, il pH, la tessitura, l'idratazione del suolo, il contenuto di nutrienti e di sostanza organica, la salinità, l'inquinamento del suolo (Liesack et al., 1997). Un importante fattore di regolazione per la comunità microbica del suolo è anche la copertura vegetale, in quanto questa determina la qualità, la quantità e la distribuzione temporale e spaziale delle risorse trofiche per i decompositori ed influenza la temperatura e l'umidità degli strati superficiali del suolo, che sono quelli in cui è maggiormente concentrata l'attività biologica. Pochi lavori hanno focalizzato l'attenzione sull'effetto delle variazioni di copertura vegetale sulla comunità microbica del suolo in area mediterranea (Rutigliano et al., 2004), nonostante tali variazioni siano frequenti, in quanto associate a cambiamenti di uso del territorio, al taglio e all'incendio della vegetazione e alla afforestazione o riforestazione di aree nude.

La ricerca ha avuto l'obiettivo di valutare la diversità della microflora edafica di suoli mediterranei in funzione della copertura vegetale. La diversità della comunità microbica è stata valutata in termini di diversità funzionale e, per il quarto dei casi studio di seguito riportati, anche in termini di diversità genetica. Le misure di diversità sono state associate a misure ampiamente utilizzate in letteratura per caratterizzare la microflora edafica, quali la biomassa e l'attività microbica totale, e alla determinazione di alcuni parametri fisico-chimici (pH, carbonio organico, tenore idrico).

La ricerca si è articolata in 4 casi studio. Il primo caso studio ha avuto lo scopo di valutare l'effetto dell'introduzione di una specie vegetale invasiva sulla diversità funzionale, la biomassa e l'attività della microflora edafica. A tale scopo è stato confrontato il suolo di un robinieto con i suoli di una pineta e di una lecceta situati all'interno del Parco Nazionale del Vesuvio. La *Robinia pseudoacacia* L., originaria dell'America del Nord, è oggi ampiamente diffusa in tutta l'Europa e costituisce la pianta esotica più coltivata al mondo per la produzione di legno e miele (Boring & Swank, 1984), nonché per la riforestazione di aree degradate. Essa è stata utilizzata sul Somma-Vesuvio per il rimboschimento e per il consolidamento di pendii franosi, ma è penetrata in altre formazioni boschive e costituisce una seria minaccia per la vegetazione naturale, in quanto tende a sostituirsi alle specie autoctone, costituendo boschi monospecifici. La presenza di una specie estranea alla flora locale e la riduzione della diversità vegetale potrebbe influenzare la comunità microbica del suolo e questo potrebbe avere ripercussioni sul funzionamento dell'intero ecosistema.

Il secondo caso studio ha avuto l'obiettivo di analizzare l'effetto dell'introduzione di specie vegetali autoctone sulla diversità funzionale, la biomassa e l'attività della comunità microbica di suoli nudi. Questo studio è stato sviluppato, in collaborazione con l'Ente Parco Nazionale del Vesuvio, nell'ambito del progetto "Desertnet", che si inquadra nel programma comunitario INTERREG III B e che ha avuto per obiettivo il monitoraggio ed il controllo per la lotta alla desertificazione negli ecosistemi delle regioni mediterranee, ed in particolare ha voluto stabilire il contributo di opere di ingegneria naturalistica al miglioramento delle proprietà del suolo. Gli interventi, sono stati effettuati sulle pendici più aride ed acclivi del Vesuvio, sulle quali la vegetazione attecchisce con difficoltà e la successione naturale si blocca ai primi stadi inibendo l'evoluzione della copertura vegetale e la formazione del suolo. Lo scopo degli impianti è quello di promuovere la colonizzazione del suolo da parte delle specie vegetali autoctone al fine di stabilizzare tali pendii franosi e favorire la formazione del suolo.

Il terzo caso studio e il quarto caso studio si sono svolti nell'ambito del Progetto finanziato nel 2003 dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca dal titolo "*Analisi modellistica dei flussi di C e N in macchia mediterranea: influenza della variabilità spaziale della copertura vegetale*". In particolare il terzo caso studio ha avuto lo scopo di stabilire se la microflora edafica fosse favorita dallo sviluppo di una comunità di piante erbacee annuali all'interno di "lacune" della macchia generate da un diverso tipo di

disturbo antropico. In ambiente mediterraneo il ricorrente disturbo antropico crea delle interruzioni della vegetazione legnosa (“lacune”), che vengono velocemente colonizzate da vegetazione erbacea nei primi stadi di un’autosuccessione più che di una vera e propria successione secondaria (Mazzoleni, 1993). In particolare, all’interno della Riserva Naturale di Castel Volturno (CE), dove è stato realizzato questo studio, sono diffusi pratelli xerofili, che si sviluppano laddove la vegetazione arbustiva o arborea viene interrotta da incendi accidentali o da taglio della vegetazione, effettuato dai forestali per ridurre l’incidenza degli incendi. In parcelle sottoposte ad incendi sperimentali di differente intensità nel luglio del 2000, la macchia ha generalmente ricolonizzato l’area incendiata, tuttavia sono tuttora presenti delle interruzioni della vegetazione arbustiva, dove in primavera si sviluppano piante erbacee annuali. Analogamente pratelli di macchia sono presenti in parcelle non incendiate ed in tal caso essi probabilmente si sono sviluppati dopo un taglio della vegetazione effettuato dai forestali. Per questa ricerca, all’interno di parcelle sottoposte a differente trattamento nel 2000, ed in particolare in parcelle soggette ad incendio leggero, parcelle soggette ad incendio intenso e parcelle non incendiate, sono state seguite, mediante uno studio diacronico, le variazioni di biomassa, attività e diversità funzionale della comunità microbica del suolo nel corso dello sviluppo della comunità erbacea, dallo stadio di seme (marzo), a quello di plantula (aprile), a quello di pianta adulta (maggio) fino alla morte della parte epigea (luglio).

Il quarto caso studio si è proposto di valutare le variazioni relative alla microflora edafica in siti che presentavano una diversa copertura vegetale, in relazione al tempo trascorso dopo il taglio della vegetazione, rispettivamente un pratello, una comunità ad arbusti bassi e una comunità di macchia della Riserva Naturale di Castel Volturno (CE), mediante uno studio sincronico. Come si è detto, l’area di studio è soggetta ad incendi accidentali e ad interventi di taglio della vegetazione operati dai forestali allo scopo di ridurre l’incidenza di incendi accidentali, che determinano la coesistenza di aree a differente stadio successionale; particolarmente estese sono aree a macchia mediterranea alta, aree ad arbusti bassi e pratelli. Per poter generalizzare i risultati ottenuti in questo studio, il suolo è stato prelevato in due stagioni caratterizzate da differente disponibilità idrica, essendo l’acqua il principale fattore limitante in ambiente mediterraneo: in primavera, dopo un lungo periodo piovoso, e all’inizio dell’autunno, dopo una prolungata siccità estiva. Per tale studio oltre alla diversità funzionale, la biomassa e l’attività microbica, è stata determinata anche la diversità genetica della comunità microbica. Questo ha richiesto la

standardizzazione del metodo molecolare basato sulla caratterizzazione elettroforetica, con tecnica DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Muyzer et al., 1993), di frammenti genici ottenuti per amplificazione di sequenze nucleotidiche comprese nel gene 16S rDNA, presente nell'estratto di DNA da suolo. Per la standardizzazione di tale metodo è stato necessario confrontare due metodi per l'estrazione del DNA dal suolo, uno basato sulla lisi meccanica, l'altro sulla lisi enzimatica, al fine di individuare la procedura migliore in fatto di rese, e confrontare diverse tecniche di purificazione e quantificazione del DNA, ed in particolare una tecnica elettroforetica, una spettrofotometrica ed una fluorimetrica.

CAPITOLO III

EFFETTO DELL'INTRODUZIONE DI UNA SPECIE VEGETALE INVASIVA SULLA MICROFLORA EDAFICA

3.1 PREMESSA

La diversità biologica o biodiversità, che costituisce l'insieme di geni, specie ed ecosistemi presenti sulla Terra, è il prodotto di centinaia di milioni di anni di evoluzione ed è fondamentale per il funzionamento di tutti gli ecosistemi presenti sul pianeta. I dati disponibili mostrano che le attività umane stanno portando ad una perdita della biodiversità del pianeta e tale tendenza si accentuerà con l'ulteriore incremento della popolazione umana e del conseguente sviluppo economico (Tolba, 1992). Le piante esotiche invasive contribuiscono a ridurre la diversità biologica a livello mondiale. Le vie della migrazione oggi sono infinite. Ogni barriera biogeografica è superata infatti con la globalizzazione del commercio e con l'uso dei moderni mezzi di trasporto. L'immissione volontaria o casuale di piante in ambienti diversi da quello di origine impoverisce in genere gli ecosistemi perché i nuovi elementi, privi di controllo da parte di predatori, parassiti e competitori, spesso prendono il posto delle specie spontanee e si diffondono velocemente, rompendo equilibri ecologici che si sono stabiliti nel corso di centinaia di anni. Molte piante, come gli alberi da frutto e da legname, i cereali e i legumi, sono state introdotte in Europa prevalentemente dall'Asia e dall'Africa. Assieme alle piante coltivate sono state diffuse le prime infestanti. Al seguito di merci asiatiche e africane sono arrivate, e arrivano tuttora, diverse piante selvatiche invadenti, mentre molto più rara in genere è l'introduzione di piante infestanti australiane e neozelandesi. Frutti e ortaggi come il mais, il pomodoro, il peperone, i fagioli, le fragole giganti, la patata sono stati importati dal continente americano, ma la loro lontananza genetica con le piante selvatiche europee ha impedito ibridazioni spontanee con queste e la fragilità delle diverse cultivar importate ne impedisce tuttora la diffusione incontrollata. Molte altre piante americane importate volontariamente o casualmente hanno invece dimostrato alte potenzialità di diffusione e si riproducono abbondantemente negli ambienti coltivati e naturali. La *Robinia pseudoacacia* L. (Fig. 3.1), specie arborea originaria dell'America del Nord, è la pianta esotica più coltivata al mondo per la produzione di legno e miele (Boring & Swank, 1984), nonché per la riforestazione di aree degradate. L'inserimento della robinia nelle fitocenosi naturali o seminaturali, sia esso avvenuto attraverso pratiche antropiche o diffusione spontanea, ha provocato la costituzione di boschi monospecifici, in cui la neofita ha assunto un ruolo dominante e fortemente competitivo nei confronti delle specie autoctone, sostituendosi ad esse nella formazione di comunità forestali tipicamente accompagnate, nel sottobosco, da un corteggio floristico ruderale e nitrofilo.



Fig. 3.1 - *Robinia pseudoacacia* L., specie arborea originaria dell'America del Nord.

La *Robinia pseudoacacia* L., ampiamente diffusa in tutta l'Europa, è stata utilizzata sul Somma-Vesuvio per il rimboschimento e per il consolidamento di pendii franosi, è penetrata in altre formazioni boschive e costituisce una seria minaccia per la vegetazione naturale. In anni recenti i problemi ed i rischi legati alle specie esotiche si sono manifestati con maggiore frequenza, guadagnando la crescente attenzione della ricerca in campo ecologico. Diversi autori hanno affrontato l'argomento occupandosi prevalentemente di studi relativi alle caratteristiche ecologiche delle specie invasive (Williamson M.H., Fitter A., 1996; Milewski et al., 1991), la competizione interspecifica (Walker L.R., Vitousek P.M., 1991; Matson P., 1990) e la formulazione di modelli matematici mirati alla descrizione delle modalità di diffusione delle piante invasive (Higgins et al., 1995; Pyšek al., 2002). Gli studi riguardanti gli effetti dell'introduzione di una specie invadente sulle

proprietà del suolo e soprattutto sulla diversità della comunità edafica (Kourtev et al., 2002; Callaway et al., 1999; Marler et al., 1999) non si riferiscono mai all'area mediterranea.

Dal momento che i microrganismi svolgono una funzione essenziale nei cicli biogeochimici degli elementi nutritivi, prendendo parte attiva nel mantenimento di un ecosistema stabile e sostenibile, diventa fondamentale individuare anche la relazione tra presenza di specie esotiche e funzionamento della comunità microbica del suolo. Tale funzionamento è legato, oltre che alla biomassa e all'attività microbica, anche alla diversità della microflora edafica (Kennedy and Smith, 1995; Griffith et al., 1999; Othonen et al., 1997).

Obiettivo di questa ricerca è valutare l'effetto della presenza della *Robinia pseudoacacia* L. nel Parco Nazionale del Vesuvio sulla biodiversità funzionale, sulla biomassa e sull'attività della comunità microbica di un suolo sviluppatosi su substrato lavico, mediante il confronto tra il suolo del robinieto e i suoli di un bosco di pino domestico (specie naturalizzata utilizzata per la ricolonizzazione del substrato vulcanico) e di un bosco di leccio (specie autoctona), situati all'interno del Parco nazionale del Vesuvio.

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 Area di studio

I prelievi di suolo sono stati effettuati all'interno del Parco Nazionale del Vesuvio (Napoli), che è stato istituito nel 1995 e si estende su di una superficie di 8482 ettari. Nel giugno del 1997 il Parco Nazionale del Vesuvio è stato inserito nella rete Unesco del progetto MAB (Man and Biosphere) quale riserva della biosfera. Già a partire dai primi del '900, dopo la catastrofica eruzione del 1906, in questa zona si è dato inizio ad una serie di attività di rimboschimento (Agostini, 1975). Tra il 1965 e il 1975, nel Parco Nazionale del Vesuvio, furono impiantate diverse specie arboree per la riforestazione e per il consolidamento di pendii franosi. Tra queste abbiamo l'ontano, la ginestra dell'Etna, la ginestra dei carbonai, la ginestra di Spagna ed infine la robinia e il pino. Nell'Atrio del Cavallo è stata piantata nel 1960, su materiale piroclastico del 1944, la *Robinia pseudoacacia* L., che attualmente è presente, in quest'area, come bosco monospecifico. Con il tempo la robinia è diventata invasiva, sostituendo le specie vegetali preesistenti dell'area. Il suolo, con tessitura moderatamente grossolana e buona disponibilità di ossigeno (Molli – Vitric Cambisols (Calcaric), di Gennaro et al., 2002) è stato prelevato, alla profondità di 0-5 cm, in un robinieto (*Robinia pseudoacacia* L.), sito in zona Atrio del Cavallo (Valle del Gigante, Fig. 3.2), ad un altitudine di circa 800 m s.l.m., su materiale dell'ultima eruzione (1944). I prelievi di suolo sono stati effettuati nel giugno 2003 in 4 repliche di campo. I risultati ottenuti sono stati poi confrontati con i dati ottenuti da Iovieno et al. (dati non pubblicati) in suoli prelevati nel giugno 2002 nel Piano delle Ginestre del Parco Nazionale del Vesuvio (su substrato lavico del 1944) in un bosco di pino domestico (*Pinus pinea* L.), specie naturalizzata utilizzata per la ricolonizzazione del substrato vulcanico, e in un bosco di di leccio (*Quercus ilex* L.), che costituisce la specie arborea dominante nella vegetazione matura dell'area di studio. Sia nella pineta che nella lecceta i prelievi di suolo sono stati effettuati in 4 repliche di campo.

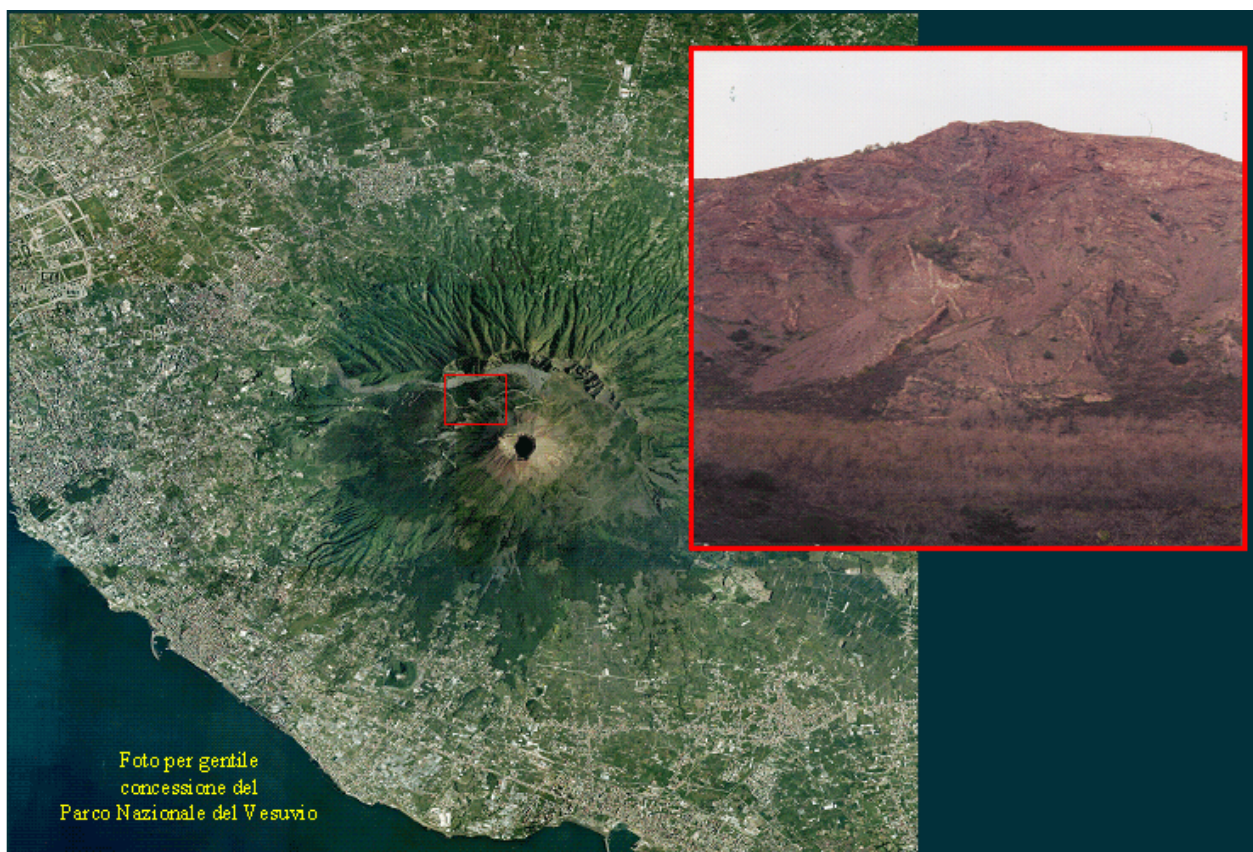


Fig. 3.2 - Area di studio. A sinistra: foto da satellite del Vesuvio. A destra: sito di campionamento: Atrio del Cavallo, situato in zona Valle del Gigante, all'interno del Parco Nazionale del Vesuvio.

3.2.2 Analisi del suolo

Sui campioni di suolo sono state effettuate misure di parametri chimici (pH, tenore idrico, contenuto di carbonio organico) e biologici (biomassa e attività microbica, risposta respiratoria all'aggiunta di substrati semplici). Per la determinazione del contenuto di C organico è stato utilizzato suolo essiccato a 75°C, in modo da bloccare l'attività biologica, senza tuttavia mineralizzare la sostanza organica. Il contenuto di carbonio organico è stato ricavato indirettamente a partire dalla sostanza organica dei suoli, tenendo conto che esso in genere rappresenta il 58% della materia organica. La sostanza organica contenuta nel suolo è stata determinata per incenerimento di 1 g di terreno secco, in una muffola a 550°C per due ore (Allen, 1974).

Tutti gli altri parametri considerati sono stati determinati su suolo fresco conservato a 4°C fino al momento della misura. La determinazione del pH è avvenuta per via potenziometrica mediante un pHmetro della Hanna Instruments (Metrhon 665 Dosimat) sul

surnatante ottenuto da una miscela di terreno e acqua distillata (rapporto 1:2.5) fatta oscillare per 20 minuti e poi lasciata sedimentare.

Il tenore idrico, che rappresenta la quantità di acqua presente nel terreno al momento del prelievo, è stato espresso come percentuale di acqua riferita al terreno secco ed il suo valore è stato determinato, per via gravimetrica, seccando in stufa a 75°C quantità note di suolo setacciato fino al raggiungimento del peso costante.

La biomassa microbica è stata stimata con il metodo della Substrate-Induced Respiration (SIR, Sparling, 1995; Degens et al., 2001), che si basa sulla misura dell'evoluzione di CO₂ dal suolo in risposta all'aggiunta di glucosio, un substrato facilmente mineralizzabile dalla microflora edafica, dopo incubazione del suolo in condizioni controllate di temperatura e umidità. Il valore di risposta respiratoria così ottenuto è risultato correlato alla quantità di biomassa microbica attiva presente nel campione e per questo può essere convertito in quantità di biomassa microbica. Ad una quantità di suolo fresco equivalente ad un grammo di suolo secco sono stati aggiunti 2 ml di una soluzione 75 mM di D-glucosio. Dopo quattro ore di incubazione a 25°C è stata misurata, mediante gascromatografo (Fisons GC 8000; Fisons Instruments), la quantità di CO₂ evoluta da ciascun campione in seguito all'aggiunta di D-glucosio. La quantità di carbonio della biomassa microbica è stata ricavata mediante la seguente equazione (Sparling, 1995):

$$\mu\text{g C g}^{-1} \text{ suolo} = 50.4 \times \text{respirazione } (\mu\text{l CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suolo h}^{-1})$$

La respirazione basale del suolo, misurata come evoluzione di CO₂, rappresenta una stima del metabolismo degli organismi edafici; più ricca e più attiva è la comunità edafica, maggiore è l'evoluzione di CO₂ dal suolo. Secondo Parker & Doxtader, (1983) l'attività microbica è responsabile del 71% dell'evoluzione totale di CO₂ dal suolo. La misura della respirazione condotta in laboratorio costituisce una stima del metabolismo della microflora e della microfauna, dato che le analisi sono state effettuate su suoli setacciati, privi delle radici delle piante e della fauna di maggiori dimensioni. La respirazione basale è stata stimata misurando, mediante gascromatografo, la CO₂ evoluta, dopo quattro ore di incubazione a 25°C, dal suolo in seguito all'aggiunta di 2 ml di acqua deionizzata (Degens et al., 2000). Per conoscere il grado di attività della microflora presente nel suolo, è stato calcolato il quoziente metabolico (qCO₂) che costituisce il C evoluto come CO₂ per unità di C microbico ($\mu\text{g C}_{\text{CO}_2} \text{ mg}^{-1} \text{ C}_{\text{mic}} \text{ h}^{-1}$). Questo parametro assume valori più elevati a seguito di un disturbo che generi condizioni sfavorevoli per i microrganismi (Wardle e

Ghani, 1995; Bauhus et al., 1998), nelle quali questi investono una maggiore frazione dell'energia disponibile per il mantenimento piuttosto che per l'accumulo di biomassa. Inoltre per conoscere la velocità di mineralizzazione della sostanza organica è stato calcolato il coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM), che è dato dalla frazione di C organico evoluto come CO₂ ($\text{mg C}_{\text{CO}_2} \text{ g}^{-1} \text{ C}_{\text{org}} \text{ h}^{-1}$).

La biodiversità delle comunità microbiche del suolo è stata valutata, in questo caso studio, come diversità funzionale. Questa è stata determinata secondo il metodo proposto da Degens et al. (2000), che è apparso più idoneo per la stima della diversità funzionale rispetto all'uso di piastre BIOLOGTM, che presuppone l'uso di terreni solidi di coltura, costituiti da differenti substrati (Zak et al., 1994). I terreni di coltura utilizzati per il BIOLOGTM, pur contenendo la soluzione di inoculo, non sono in realtà molto differenti dalle piastre di agar (Degens e Harris, 1997). Dal momento che poco più dell'1 % dei microrganismi del suolo può crescere su piastre di agar (Domsch et al., 1979; Fægri et al., 1977; Gray, 1990), il metodo BIOLOGTM non ci è sembrato idoneo a fornire un'accurata indicazione della diversità funzionale della comunità microbica del suolo.

La diversità funzionale comprende, come si è detto, due componenti: la ricchezza (richness) e l'omogeneità (evenness). La ricchezza include l'insieme delle funzioni svolte dai microrganismi, quali la decomposizione, le trasformazioni di nutrienti, la promozione/soppressione della crescita delle piante (Giller et al., 1997), mentre l'omogeneità rappresenta la distribuzione dell'attività dei microrganismi tra le possibili funzioni. In questo studio è stata saggiata soltanto l'omogeneità catabolica (*catabolic evenness*), misurando l'incremento di respirazione indotto da diversi substrati semplici e calcolando l'indice di Simpson-Yule, che assume valori tanto più elevati quanto più uniforme è la ripartizione dell'attività microbica tra le funzioni considerate. Il metodo proposto da Degens et al. (2000) si basa sulla misura dell'incremento a breve termine della respirazione (valutata come evoluzione di CO₂) da parte di ciascun campione di suolo, precedentemente setacciato (maglie del setaccio: 2mm) e conservato a 4°C, in seguito all'aggiunta di 25 substrati organici semplici, rispetto ai relativi campioni senza substrato, nei quali viene aggiunta solo acqua distillata. I substrati usati nel saggio sono 15 acidi carbossilici (ac. urocanico, ac. succinico, ac. citrico, ac. L-ascorbico, ac. gluconico, ac. malonico, ac. DL-malico, ac. α -chetoglutarico, ac. fumarico, ac. chinico, ac. α -chetovalerico, ac. pantotenico, ac. α -chetobutirrico, ac. tartarico, ac. urico) 7 amminoacidi (L-lisina, L-istidina, ac. L-glutammico, L-serina, L-arginina, L-asparagina, L-glutammina) e 3 carboidrati (D-glucosio, D-mannosio, D-glucosammina). I substrati sono stati portati in

soluzione acquosa con concentrazione di 100 mM per gli acidi organici, 15 mM per gli amminoacidi, 75 mM per i carboidrati (Degens e Vojvodic-Vukovic, 1999), ed il pH aggiustato ad un valore compreso tra 5.8-6.0 (Degens, 1998). Ai campioni di suolo sono stati aggiunti, singolarmente i diversi substrati, nella misura di 2 ml di soluzione (Degens e Harris, 1997). I vials da 30 ml contenenti il campione di suolo ed il substrato sono stati chiusi ermeticamente con tappi in butile sostenuti da una ghiera metallica e sono stati incubati per un periodo di 4 ore, al buio ed alla temperatura di 25° C. Durante l'incubazione, ad intervalli di un'ora, i campioni sono stati sottoposti ad agitazione. La CO₂ evoluta durante il periodo di incubazione è stata misurata prelevando 2,5 ml di gas ed iniettandoli in un gascromatografo Fisons mod. GC8000 munito di sistema di campionamento con loop da 1 ml.

L'incremento dell'evoluzione di CO₂ per effetto dell'aggiunta di ciascun substrato è stato utilizzato per ottenere il profilo delle risposte cataboliche e per calcolare l'*indice di diversità di Simpson-Yule*: $E=1/\sum p_i^2$, dove p_i è l'incremento di respirazione indotto da ogni substrato in rapporto all'incremento totale di respirazione indotto da tutti i substrati (Magurran, 1988). Questo indice valuta l'omogeneità catabolica (E) ovvero il grado di equiripartizione del catabolismo microbico all'interno del pool di substrati considerati. In tal modo il massimo di omogeneità catabolica (E = 25) si ottiene quando tutti i substrati danno la stessa risposta.

3.2.3 Elaborazione statistica dei dati

Per ogni parametro sono stati calcolati la media e l'errore standard delle 4 repliche di campo. I suoli prelevati nei diversi boschi (robinieto, pineta e lecceta) sono stati confrontati, per ciascun parametro, mediante l'Analisi della Varianza ad una via, seguita da Student Newman Keuls test (P<0,05) mediante il software Sigma Stat 1.0. Le correlazioni tra i diversi parametri sono state saggiate mediante il coefficiente di Pearson (Sigma Stat 1.0).

3.3 RISULTATI

Il suolo del robinieto è risultato caratterizzato da valori di carbonio organico e tenore idrico significativamente più bassi di quelli misurati nei suoli della lecceta e della pineta (Tab. 3.1).

Sistema	pH	Tenore idrico (%)	CarbonioOrganico (g kg ⁻¹)
Robiniето	5.620 (± 0.054) ^a	16,102 (± 0,699) ^a	36,470 (±2,418) ^a
Pineta	4.548 (± 0.094) ^b	38,611(± 5,924) ^{ab}	278,980 (±23,538) ^b
Lecceta	5,393 (±0,099) ^a	42,070 (± 5,645) ^b	217,790 (±16,719) ^c

Tabella 3.1 - Valori medi (± errore standard) di pH, tenore idrico, carbonio organico dei suoli prelevati nel robinieto, nella pineta e nella lecceta. Lettere diverse in apice ai valori medi indicano differenze significative tra i suoli sotto differente copertura arborea.

Il pH è invece risultato più elevato nei suoli del robinieto e della lecceta che nel suolo della pineta (Tab. 3.1). Il contenuto di carbonio organico e il tenore idrico sono risultati positivamente correlati tra loro (Tab. 3.2).

pH								
T.idrico %	-0,450							
Corg	-0,791**	0,809**						
Cmic	-0,349	0,657*	0,767**					
RB	-0,635*	0,825**	0,965***	0,853***				
qCO2	-0,385	0,101	0,132	-0,530	-0,099			
CEM	0,731**	-0,690**	-0,854***	-0,676*	-0,765**	-0,020		
CE	-0,038	0,661*	0,426	0,698**	0,501	-0,546*	-0,571*	
IMR	-0,416	0,735**	0,818***	0,956***	0,871***	-0,366	-0,760**	0,753**
	pH	Tenore idrico %	Corg	Cmic	RB	qCO₂	CEM	CE

Tabella 3.2 - Coefficienti di correlazione lineare di Pearson tra i parametri considerati (* = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001; 13<n<14)

La biomassa microbica e la respirazione basale (Fig. 3.3) sono risultate significativamente più basse nel suolo del robinieto che nei suoli della lecceta e della pineta. Il coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM, Fig. 3.3) è risultato al contrario più alto nel suolo del robinieto, mentre il qCO_2 (Fig. 3.3) non differisce tra i suoli considerati. La biomassa microbica e la respirazione basale sono risultate positivamente correlate al tenore idrico e al contenuto di carbonio organico del suolo (Tab.3.2).

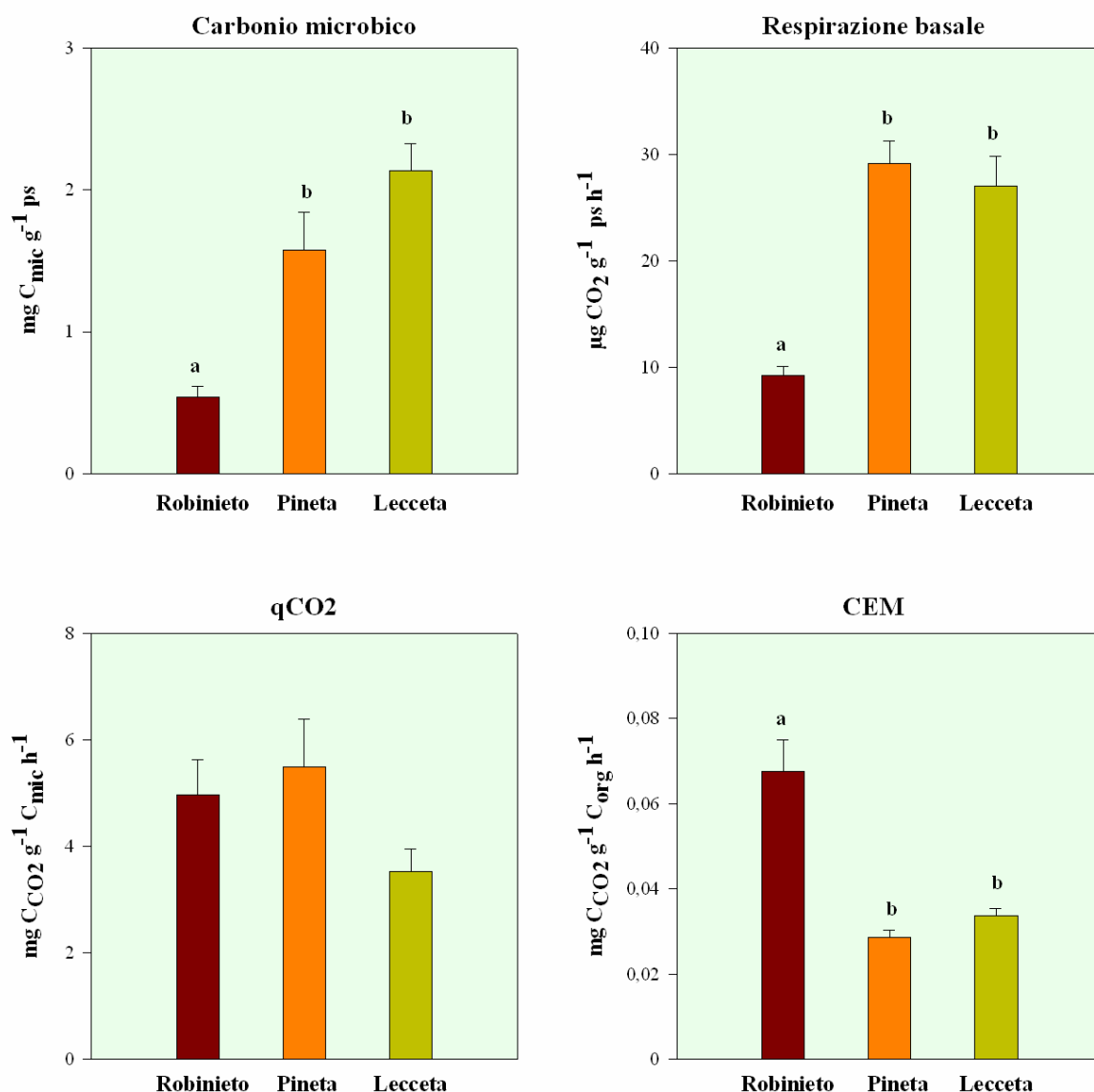


Fig 3.3 – Valori medi (\pm errore standard) di carbonio microbico, respirazione basale, quoziente metabolico (qCO_2) e coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM) dei suoli di robinieto, pineta e lecceta. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative tra i suoli studiati.

Il profilo di risposta catabolica (Fig.3.4) ha mostrato che l'aggiunta di tutti i substrati ha determinato un incremento di respirazione. Il suolo del robinieto (Fig. 3.4) ha presentato un incremento medio di respirazione (IMR) significativamente inferiore rispetto a quello dei suoli della pineta (Fig. 3.4) e della lecceta (Fig. 3.4). L'indice di omogeneità catabolica (CE) è risultato significativamente minore nei suoli del robinieto (17; Fig. 3.4) e della pineta (18, Fig.3.4) che nel suolo della lecceta (20, Fig. 3.4). Non sono state invece osservate differenze significative di indice di omogeneità catabolica del suolo tra pineta e robinieto. Sia l'indice di omogeneità catabolica che l'incremento medio di respirazione dovuto all'aggiunta di substrati sono risultati correlati positivamente al tenore idrico del suolo (Tab. 3.2); l'incremento medio di respirazione è anche risultato correlato positivamente al contenuto di carbonio organico del suolo (Tab. 3.2).

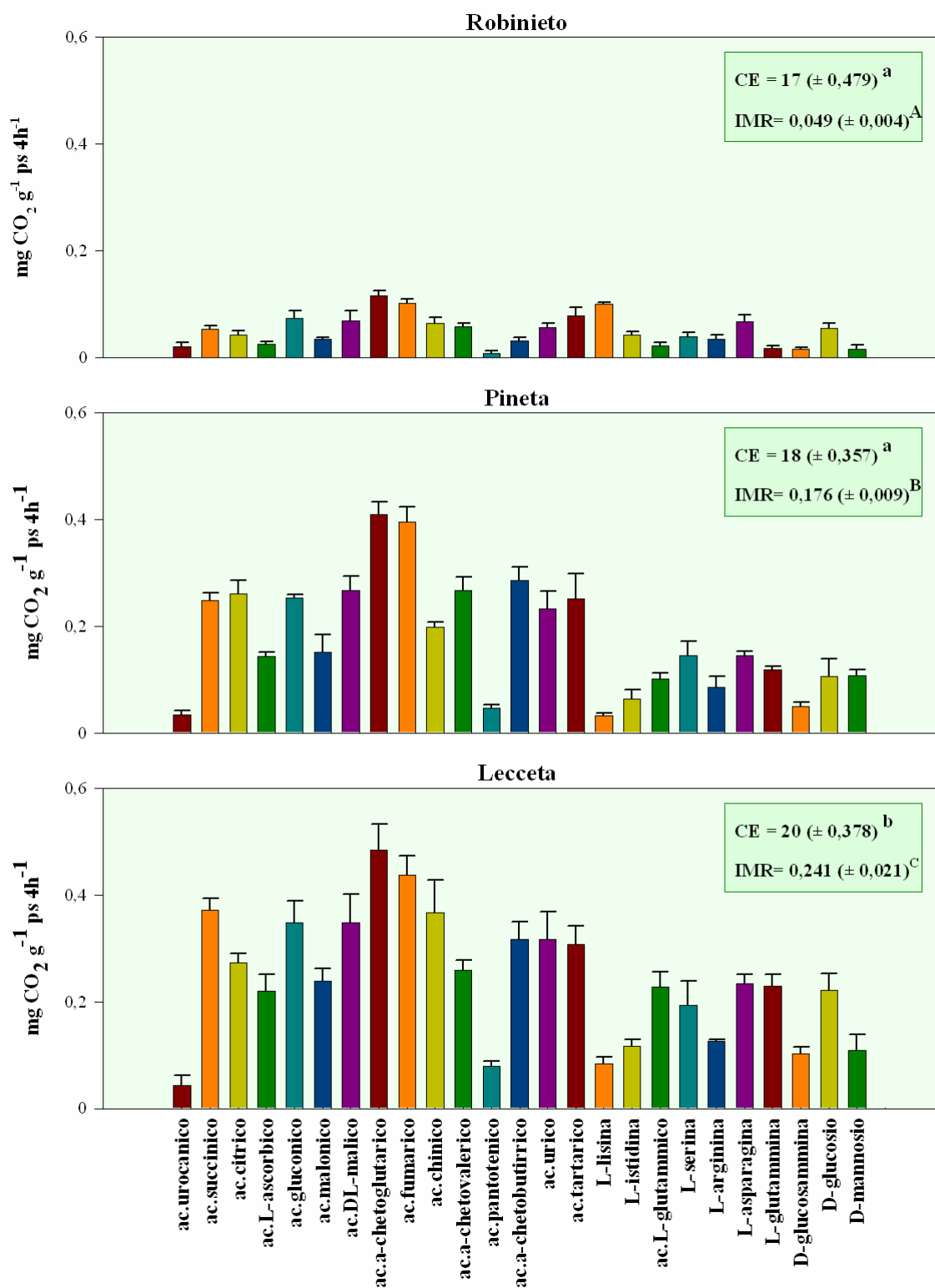


Fig 3.4 – Profili di risposta catabolica dei suoli del robinieto, della pineta e della lecceta, misurati come incremento dell'evoluzione di CO₂ (mg CO₂ g⁻¹ suolo 4h⁻¹). Sulle barre è riportato l'errore standard. In alto a destra sono riportati i valori degli indici di omogeneità catabolica (CE ± errore standard) e degli incrementi medi di respirazione (IMR ± errore standard) dovuti all'aggiunta dei 25 substrati; lettere diverse in apice indicano differenze significative tra i suoli studiati di CE (lettere minuscole) e di IMR (lettere maiuscole).

3.4 DISCUSSIONE

Dai risultati è emerso che il suolo del robinieto è caratterizzato da una minore riserva di C organico rispetto ai suoli della pineta e della lecceta. La ridotta quantità di C organico potrebbe spiegare il ridotto contenuto idrico del suolo del robinieto, infatti i due parametri sono risultati positivamente correlati. E' noto che la sostanza organica del suolo trattiene acqua. I polisaccaridi e le sostanze umiche possono infatti trattenere acqua fino a quattro volte il loro peso a causa dell'elevato numero di gruppi funzionali idrofili presenti sulle molecole (Nannipieri, 1993). La già scarsa quantità di C organico del suolo del robinieto è anche soggetta ad una più rapida degradazione, come dimostrano i valori più alti di velocità di mineralizzazione del C organico (CEM).

La biomassa e l'attività (respirazione potenziale) della comunità microbica del suolo sono risultate ridotte nel suolo del robinieto rispetto agli altri suoli considerati, in accordo con la minore disponibilità di C organico e di acqua osservata in questo suolo. Infatti la biomassa e l'attività microbica sono risultate correlate sia al tenore idrico che al contenuto di sostanza organica. Anche l'incremento medio di respirazione indotto dall'aggiunta di substrati semplici è risultato ridotto nel suolo del robinieto, dimostrando che la ridotta attività della comunità microbica osservata in questo suolo non dipende solo dalla disponibilità di C organico e di acqua. Infatti l'incremento medio di respirazione viene misurato in condizioni non limitanti di acqua e di almeno un substrato organico. I valori più bassi, rispetto alla lecceta, di indice di omogeneità catabolica e di incremento medio di respirazione, sono stati osservati, oltre che nel suolo del robinieto, anche nel suolo della pineta, evidenziando che la presenza del pino, seppure in maniera meno evidente rispetto alla robinia, non favorisce quanto il leccio la diversità funzionale della microflora edafica. Degens et al. (2001) hanno riportato che suoli caratterizzati da bassa diversità funzionale sono più vulnerabili a trattamenti di stress (riduzione di pH, incremento di salinità, incremento della concentrazione di rame) o di disturbo (cicli di gelo/disgelo e di idratazione/disidratazione del suolo), subendo ulteriori riduzioni dell'indice di diversità funzionale. Eaton e Farrell (2004) hanno confrontato la diversità catabolica e genetica, i livelli di nitrato, ammonio, carbonio organico e il pH di suoli coperti da alberi di *Robinia pseudoacacia* con quelli di suoli coperti da alberi di *Liriodendron tulipifera*, in una foresta mista in Pennsylvania. Questi autori hanno riscontrato variazioni significative di questi parametri tra i suoli prelevati sotto copertura di *Robinia pseudoacacia* e quelli prelevati sotto copertura di *Liriodendron tulipifera*. Le condizioni del suolo di *Robinia*

pseudoacacia erano più favorevoli alla nitrificazione, come indicato dai più elevati valori di NO_3^- e di N minerale totale, insieme a valori più bassi di NH_4^+ , probabilmente grazie ai valori più alti di pH e di carbonio organico. I suoli con copertura di *Robinia pseudoacacia* mostravano una più elevata diversità genetica, ma una più bassa diversità catabolica. Secondo questi autori i risultati ottenuti indicano che le caratteristiche dei suoli di *Robinia pseudoacacia*, confrontate con quelle dei suoli prelevati sotto *Liriodendron tulipifera*, determinano la presenza di comunità microbiche più specializzate, selezionando per gruppi che favoriscono una più spinta nitrificazione e che presentano una maggiore diversità genetica e biomassa microbica, un minor numero di gruppi funzionali, ma con una maggiore specializzazione nei vari processi catabolici.

Kourtev et al. (2002) hanno confrontato la struttura (mediante analisi della composizione dei PLFA) e la diversità funzionale delle comunità microbiche di suoli prelevati sotto due specie esotiche (*Barberis thunbergii* e *Microstegium vimineum*) e sotto una specie nativa (*Vaccinium* sp.pl.) in una foresta a Nord del New Jersey (USA). Questi autori riportano che i suoli prelevati sotto le specie esotiche risultano modificati nella struttura e nella diversità funzionale delle comunità microbiche rispetto ai suoli prelevati sotto le specie native, e che questo effetto può estendersi dalla rizosfera al suolo circostante tramite il movimento di composti organici solubili rilasciati dalle radici, oppure tramite il flusso dell'acqua attraverso i macropori del suolo, ma anche attraverso il movimento dei microrganismi coadiuvato dal flusso dell'acqua attraverso i macropori.

L'insieme dei risultati di questo lavoro mostra che il suolo del robinieto è meno favorevole allo sviluppo, all'attività e alla diversificazione della comunità microbica. Diversi autori (Callaway R., 1999; Walker e Smith, 1997; Marler et al., 1999) hanno osservato che l'invasione di una specie esotica può alterare le proprietà del suolo. Poiché la diversità, la biomassa e la distribuzione della microflora dipendono strettamente da queste proprietà, la presenza della specie esotica invasiva potrebbe causare modificazioni anche della composizione del biota del suolo. Per esempio è noto che i semi di *Robinia pseudoacacia* contengono un peptide termostabile a basso peso molecolare con attività antibatterica, saggiata su alcuni gruppi di batteri Gram(+) e Gram(-) (Oğraş et al., 2005). E' stato ipotizzato che tale peptide agisca con un meccanismo diverso da quello degli antibiotici, cioè formando un canale attraverso la membrana cellulare che provoca la fuoriuscita dei liquidi intracellulari con conseguente morte della cellula.

Inoltre la tendenza della *Robinia pseudoacacia* a costituire boschi monospecifici, con sottobosco costituito quasi esclusivamente da rovi generalmente di *Rubus ulmifolius*,

Rubus canescens, causa una riduzione dell'eterogeneità della lettiera e questo potrebbe determinare la riduzione della diversità di detritivori e decompositori (Sulkava e Huhta, 1998; Hansen, 2000), con conseguente riduzione anche della diversità funzionale. Nella pineta e nella lecceta considerati in questo studio le specie dominanti sono invece accompagnate da un ricco e diversificato sottobosco che include per esempio specie di corbezzolo (*Arbutus unedo*), fillirea (*Phillyrea latifolia*), lentisco (*Pistacia lentiscus*), terebinto (*Pistacia terebinthus*), lentaggine (*Viburnum tinus*), rosa selvatica (*Rosa sempervirens*), alaterno (*Rhamnus alaternus*), asparago selvatico (*Asparagus acutifolius*) e specie lianose come la robbia (*Rubia peregrina*), la smilace (*Smilax aspera*) e l'edera (*Hedera helix*).

3.5 CONCLUSIONI

La specie esotica invasiva *Robinia pseudoacacia* L. tende a conferire al suolo proprietà chimiche e biologiche diverse rispetto a quelle riscontrate nei suoli della specie nativa, *Q. Ilex* L. e della specie naturalizzata *P. pinea* L. In particolare il suolo del robinieto è risultato caratterizzato da valori più bassi, rispetto agli altri suoli considerati, di carbonio organico, contenuto idrico, biomassa microbica, respirazione, incremento medio di respirazione e valori più alti del coefficiente di mineralizzazione endogena. Inoltre esso ha presentato valori di omogeneità catabolica simili a quelli del suolo della pineta ma più bassi di quelli del suolo della lecceta. L'effetto negativo della robinia sulla comunità microbica del suolo potrebbe essere dovuto all'attività antibatterica dei peptidi contenuti nei semi di questa pianta, ma anche alla omogeneità della lettiera, data la sua tendenza a formare boschi monospecifici.

CAPITOLO IV

**EFFETTO DELL'INTRODUZIONE DI SPECIE VEGETALI
AUTOCTONE, REALIZZATA MEDIANTE INTERVENTI DI
INGEGNERIA NATURALISTICA, SULLA COMUNITA'
MICROBICA DEL SUOLO**

4.1 PREMESSA

La desertificazione è definita come "il processo che porta ad una riduzione irreversibile della capacità del suolo di produrre risorse e servizi" (FAO-UNEP-UNESCO, 1979), ovvero di supportare la produzione di biomassa a causa di variazioni climatiche e di attività antropiche. Tale processo interessa attualmente i 2/3 delle terre asciutte coltivate (3,6 su un totale di 5,2 miliardi di ettari). È un problema di carattere globale che colpisce più di 100 paesi in tutti i continenti, indipendentemente dalla loro collocazione geografica, polare o tropicale, e circa un miliardo di persone.

La conferenza di Rio del 1992 su Ambiente e Sviluppo promuove la Convenzione per la Lotta contro la Desertificazione nei paesi colpiti da forte siccità e/o desertificazione, con particolare urgenza in Africa. L'Africa è infatti il continente più colpito dalla desertificazione, tuttavia anche i paesi europei che si affacciano sul Mediterraneo (Spagna, Italia, Grecia, Turchia) sono esposti al rischio di desertificazione. Eventi quali siccità, inondazioni, incendi delle foreste, insieme allo sfruttamento eccessivo delle risorse idriche e dei suoli agricoli, alle pratiche irrazionali di irrigazione, all'uso di fertilizzanti e pesticidi, all'inquinamento da metalli pesanti hanno causato un forte degrado del suolo e la riduzione della produttività vegetale, innescando così il processo di desertificazione. Un elemento comune che inconfutabilmente associa le aree soggette a desertificazione è costituito dal processo di erosione del suolo, ossia la progressiva riduzione dello strato superficiale del suolo e della sua capacità produttiva.

La perdita di suolo ed in particolare di sostanza organica, causata da processi erosivi naturali o indotti e favoriti dall'uomo, può comportare una alterazione degli equilibri dell'intero ecosistema, in quanto, come si è detto, il suolo fornisce ai produttori primari degli ecosistemi terrestri i nutrienti minerali e l'acqua, ed è il supporto strutturale delle radici e l'habitat dei microrganismi e della pedofauna. Aree ad elevata pendenza sono naturalmente esposte a fenomeni di erosione, che sono ulteriormente favoriti dall'assenza o dalla limitata presenza di vegetazione. Una elevata perdita di suolo per processi erosivi, specie se associata alla riduzione della copertura di piante perenni e all'impoverimento della flora, indica che è in atto un processo di degradazione che può culminare nella desertificazione del suolo.

I fenomeni di desertificazione ed erosione del suolo possono essere contrastati da opere di Ingegneria Naturalistica. Il termine di Ingegneria Naturalistica (I.N.) si riferisce all'insieme di quelle tecniche che, praticate per ridurre il rischio di erosione del terreno negli interventi

di consolidamento, prevedono l'utilizzo di piante vive o parti di esse (semi, radici, talee), da sole o in combinazione con materiali naturali inerti (legno, pietrame o terreno), materiali artificiali biodegradabili (biostuoie, geojuta) o materiali artificiali non biodegradabili (reti zincate, geogriglie, georeti, geotessili). In relazione alle diverse condizioni ambientali di intervento (ad esempio, geomorfologiche) si possono integrare più tecniche di I.N.

Le piante utilizzate devono essere:

- autoctone, compatibili con l'ambiente e non dannose alle altre specie naturalmente presenti, nel rispetto di tutto l'ecosistema;
- pioniere, ossia capaci di colonizzare e resistere in ambienti non favorevoli e/o sterili;
- con specifiche caratteristiche biotecniche (resistenza a trazione delle radici, resistenza alla sommersione e all'inghiottimento).

La scelta di una o più specie è soggetta a parametri come siccità, acidità del terreno, salinità, temperatura, località (luogo dell'impianto). In Italia l'utilizzo delle opere di I.N. è cominciato intorno alla fine dell'800, quando cioè iniziarono a diffondersi in Europa le tecniche di gestione forestale. Furono soprattutto i tempi brevi di realizzazione e la relativa economia con cui si lavorava (ad esempio l'uso di materiali naturali reperibili direttamente sul luogo di intervento) che ne garantirono il successo e la rapida diffusione anche in altri ambiti applicativi. Negli ultimi anni, in Italia, si è registrata una maggiore sensibilità nei confronti dell'ambiente in generale ed in particolar modo della tutela del paesaggio, con un conseguente incremento nella diffusione delle tecniche di I.N..

Le tecniche di I.N. vengono applicate in diverse tipologie di ambiente:

- corsi d'acqua: consolidamento di sponde soggette ad erosione, rinaturalizzazione; costruzione di briglie e pennelli; creazione di rampe di risalita per l'ittiofauna;
- zone umide: realizzazione di ambienti idonei alla sosta e alla riproduzione degli animali;
- coste marine e lacustri: consolidamento dei litorali soggetti ad erosione e assestamento delle dune sabbiose;
- versanti: consolidamento e inerbimento dei versanti;
- infrastrutture viarie e ferroviarie: costruzione, inerbimento e rinverdimento di scarpate e svincoli; realizzazione di barriere antirumore;

- cave: recupero ambientale di cave estrattive abbandonate;
- discariche: inerbimento e rinverdimento dei rilevati.

L'utilizzo delle tecniche di I.N. è regolato dalla Legge n.415 del 18 novembre 1998 (Legge Merloni) e alcune leggi e circolari regionali.

L'impiego di tali tecniche presenta numerosi vantaggi:

- funzionali: le piante svolgono un'elevata funzione antierosiva, riducono la forza battente delle piogge, con le radici trattengono le particelle di terreno impedendo un loro dilavamento e aumentano la resistenza al taglio dei terreni;
- ecologici: gli interventi di I.N. presentano una elevata compatibilità ambientale ed una discreta biodiversità, creano habitat paraturali per la fauna (luoghi di alimentazione, riproduzione, rifugio) e consentono un ridotto impatto ambientale nella fase di cantiere (ad es. con l'utilizzo dei 'ragni', particolari mezzi per lo scavo, molto agili e di ridotte dimensioni, è possibile limitare al minimo le piste di accesso al cantiere);
- economici: i costi di realizzazione sono concorrenziali rispetto alle analoghe opere di ingegneria classica ed i costi per il ripristino ambientale del cantiere sono ridotti.

L'impiego delle tecniche può però presentare anche diversi limiti:

- funzionali: l'efficacia delle tecniche di I.N. non è sempre immediata e vi è un aumento della stessa nel tempo grazie allo sviluppo delle piante;
- tecnici e costruttivi: generalmente le opere di I.N. sono di ridotte dimensioni e presentano vari limiti di applicabilità (es. nella bonifica fluviale: limiti legati alla pendenza dell'alveo, alla velocità delle acque e al trasporto solido);
- climatici: l'elevata variabilità dei caratteri climatici (regime pluviometrico e termometrico) del territorio italiano condiziona le scelte delle specie vegetali da impiegarsi nell'I.N. (ad es. lo stress idrico estivo);
- esecutivi: il periodo di realizzazione delle opere è limitato al periodo di riposo vegetativo delle specie vegetali utilizzate; spesso vi sono difficoltà nel reperimento delle specie vegetali autoctone necessarie per l'intervento.

Nell'ambito dell'iniziativa comunitaria INTERREG III B, cooperazione transnazionale sezione B, si inquadra il progetto "Desertnet", che prevede il monitoraggio ed il controllo per la lotta alla desertificazione negli ecosistemi delle regioni mediterranee. Il progetto

affronta temi relativi allo studio, al monitoraggio e alla gestione sostenibile delle aree a rischio di desertificazione che si trovano nel bacino del Mediterraneo. Desertnet vede la collaborazione di 10 regioni, otto italiane e due spagnole, e di partner scientifici di riconosciuto livello internazionale. La regione capo fila del progetto Desertnet è la Sardegna, con il Centro interdipartimentale di Ateneo Nucleo Ricerca Desertificazione (NDR) dell'Università di Sassari. Tra i partner europei aderenti al progetto, l'Ente Parco Nazionale del Vesuvio ha proposto la verifica del contributo di opere di Ingegneria Naturalistica per il controllo dei fenomeni di erosione di suoli aridi e per il ripristino di aree prive di vegetazione su pendici acclivi in condizioni ambientali estreme. In particolare, nell'ambito di questo progetto sono stati realizzati, all'interno del Parco Nazionale del Vesuvio, diversi tipi interventi di Ingegneria Naturalistica ad una quota compresa tra i 900 e i 1000 metri s.l.m., al fine di favorire la colonizzazione da parte di specie vegetali autoctone, l'incremento della biomassa vegetale e la stabilizzazione della copertura vegetale, che con lo sviluppo degli apparati radicali contribuisce alla stabilizzazione del suolo, caratterizzato prevalentemente da pendii franosi, sui quali la vegetazione attecchisce con difficoltà e la successione naturale si blocca ai primi stadi. Obiettivo di questa ricerca è stato quello di stabilire se gli interventi di Ingegneria naturalistica avessero un effetto positivo sulla comunità microbica del suolo.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 Area di studio e disegno sperimentale

I siti scelti per la sperimentazione sono localizzati sul versante orientale del Gran Cono Vesuviano, a quota 1000, sono caratterizzati da pendenza elevata, da un terreno sabbioso con ghiaia, estremamente mobile (Fig. 4.1).



Fig. 4.1 - Area di studio. A sinistra: foto da satellite del Vesuvio. A destra: sito di campionamento, versante orientale del Gran Cono Vesuviano, all'interno del Parco Nazionale del Vesuvio.

Le condizioni climatiche dell'area dei siti sperimentali sono quelle tipiche di un'area montana mediterranea. Le precipitazioni annuali ammontano a 700-1000 mm, con pronunciata siccità estiva. L'evapotraspirazione causa la perdita di circa il 55% dell'acqua delle precipitazioni. Sebbene queste condizioni non corrispondano a quelle di un clima desertico, la limitata capacità del suolo di trattenere acqua genera condizioni critiche per il mantenimento del bilancio idrico nei mesi estivi, che sono attenuate dalle precipitazioni

occulte e inasprite dai forti venti (6,5 – 9,0 m/sec nel luglio 2003), che promuovono l'evapotraspirazione. Data la natura del substrato, il vento determina poi fenomeni di rotolamento diffuso di ciottoli, anche in assenza di precipitazioni meteoriche e incrementa l'erosione, causando l'interramento delle piante, così che la successione ecologica sulle pendici del Gran Cono non riesce a procedere oltre la fase di colonizzazione. Per gli interventi sono state scelte quattro aree (Fig. 4.2), sulle quali sono stati realizzati 4 interventi.



Figura 4.2 - Interventi di ingegneria naturalistica effettuati all'interno del Parco Nazionale del Vesuvio.
a) Trapianti e semine di erbacee pioniere. b) Rilevato a ginestre. c) Palificata di sottoscarpa. d) Palificata di controripa.

Il primo tipo di intervento (Trapianti e semine, TS; data intervento: Novembre - Dicembre 2003; Fig. 4.2 a), consiste nella semina di piante selvatiche (*Glaucium*, *Artemisia*, *Rumex*, *Helichrysum*, *Scrophularia*, *Centranthus*) in parcelle sperimentali protette dall'azione dei fattori meteorici da una pacciamatura naturale con felci dei boschi del Parco, oppure con tavolette in legno poste a monte delle piantine, per il tempo necessario all'attecchimento.

Il secondo tipo di intervento (Rilevato a ginestre, RG; data intervento: Aprile 2002; Fig. 4.2 b) consiste nel trapianto di *Spartium junceum* su rilevato in terra con funzione di barriera paramassi e di recapito e raccolta dell'acqua meteorica. Si tratta di un'opera eseguita al fine di ricavare un'area di sicurezza per la fruizione turistica del piazzale situato all'interno della Riserva Integrale Tirone Alto Vesuvio, a 1000 metri s.l.m.

Infine sono state realizzate due palificate di sostegno al sentiero di accesso al piazzale della riserva del Comune di Trecase, una di sottoscarpa (SS; Settembre – Novembre 2002; Fig. 4.2 c) posta a circa 200 metri dal sentiero ed una di controripa (CR; Febbraio – Aprile 2002; Fig. 4.2 d), posta a circa 600 metri. Le due opere drenanti sono realizzate in materiale morto e vivo. La parte morta è costituita da pali di castagno (*Castanea sativa* L.), del diametro di 16-20 cm, collegati tra loro con chiodi di acciaio del diametro di 14 mm, disposti in modo da contenere, stabilizzare ed assorbire eventuali movimenti del materiale incoerente. Nelle fasi di realizzazione delle strutture, ai differenti livelli, vengono inserite delle specie vegetali arbustive in zolla e talee interrate con il fusto. Durante la realizzazione della palificata il riempimento è stato effettuato per livelli con materiale proveniente dallo scavo, miscelato con altro terreno prelevato nel Parco per migliorare le caratteristiche agronomiche globali. Nelle palificate sono state piantate le seguenti piante:

- *Spartium junceum* L., in zolla, da vivaio;
- *Colutea arborescens* L. subsp. *gallica* Browicz, *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Coronilla emerus* L., *Crataegus monogyna* Jacq., prelevate in natura, interrate suborizzontalmente, a radice nuda, nei differenti livelli delle palificate;
- *Populus nigra* L., *Populus tremula* L. e talee, prelevate dai boschi del Vesuvio, interrate suborizzontalmente nei differenti livelli delle palificate;
- *Centranthus ruber* L. Dc, *Rumex acetosella* L. subsp. *multifolius* L., *Rumex scutatus* L., prelevate nelle vicinanze e trapiantate nelle palificate.

I siti soggetti a trattamento differivano per composizione percentuale di scheletro e terra fine nel suolo, tessitura e capacità di scambio cationico (Cattaneo, 2003). I suoli dei

trattamenti di rilevato a ginestre e di palificata di sottoscarpa hanno presentato una maggiore percentuale di terra fine rispetto ai suoli soggetti agli altri 2 interventi (trapianti e semine e palificata di controripa). Il suolo della palificata di sottoscarpa è anche risultato caratterizzato dalla maggiore quantità di frazioni di minori dimensioni nella terra fine (limo e argilla) e dalla maggiore capacità di scambio cationico (Tab. 4.1).

TIPOLOGIA DI INTERVENTO	SCHELETRO % PS	TERRA FINA % PS	SABBIA % PS	LIMO % PS	ARGILLA % PS	CAPACITA' DI SCAMBIO CATIONICO % PS
TRAPIANTI E SEMINE	56,6	43,4	98,8	1,1	0,1	2,4
RILEVATO A GINESTRE	34,3	65,7	94,4	4,8	0,8	0,4
PALIFICATA DI SOTTOSCARPA	22,3	77,7	79,9	17,4	2,7	5,2
PALIFICATA DI CONTRORIPA	46,9	53,1	94,0	5,9	0,1	0,8

Tabella 4.1 - Caratteristiche granulometriche dei suoli studiati (Cattaneo, 2003).

Il 9 febbraio 2004, sono stati effettuati prelievi di suolo sia dai siti trattati con interventi di ingegneria naturalistica (TS, RG, SS, CR) che da siti adiacenti, usati come controllo.

Per ciascuno dei siti il suolo è stato prelevato ad una profondità di 0-10 cm, in tre punti diversi.

4.2.2 Analisi del suolo

Sui campioni di suolo, setacciati mediante un setaccio in plastica con maglie di 2 mm, in modo da eliminare lo “scheletro”, sono state effettuate, come descritto nel paragrafo 3.2.2, misure di pH, tenore idrico, contenuto di carbonio organico, biomassa microbica, attività microbica e risposta respiratoria all’aggiunta di substrati semplici. Sono stati inoltre calcolati il quoziente metabolico, il coefficiente di mineralizzazione endogena e l’indice di omogeneità catabolica (CE).

4.2.3 Elaborazione dei dati

Per ogni parametro è stata calcolata la media e l'errore standard delle 3 repliche di campo di ciascun sito. Per tutti i parametri è stata saggiata la significatività delle differenze tra i diversi trattamenti, attraverso l'analisi della varianza ad una via, seguita, in caso di significatività di tale test, dallo Student-Newman-Keuls test ($P < 0,05$) mediante il software Sigma Stat 1.0. Eventuali correlazioni lineari tra i diversi parametri sono state saggiate usando il coefficiente di correlazione di Pearson (Sigma Stat 1.0).

4.2.4 Risultati

I valori di pH non hanno mostrato differenze significative tra i suoli soggetti ai trattamenti di trapianti e semine e di palificata di controripa ed i relativi controlli (Tab. 4.2).

	pH	T.I (%)	Carbonio Organico (g kg⁻¹)
TS-Controllo	6,78 ($\pm 0,06$) ^a	6,7 ($\pm 0,2$) ^{a*}	4,78 ($\pm 0,70$)
TS-Intervento	6,71 ($\pm 0,07$) ^{AB}	7,9 ($\pm 0,2$) ^A	4,01 ($\pm 0,68$) ^A
RG-Controllo	7,34 ($\pm 0,151$) ^{b*}	9,7 ($\pm 0,5$) ^{bc*}	5,64 ($\pm 1,19$) [*]
RG-Intervento	6,37 ($\pm 0,098$) ^A	5,8 ($\pm 0,2$) ^A	1,38 ($\pm 0,17$) ^A
SS-Controllo	6,91 ($\pm 0,06$) ^{b*}	9,6 ($\pm 0,2$) ^{C*}	5,76 ($\pm 0,75$) [*]
SS-Intervento	8,15 ($\pm 0,015$) ^B	19,2 ($\pm 0,5$) ^B	15,83 ($\pm 1,47$) ^B
CR-Controllo	6,56 ($\pm 0,054$) ^a	7,9 ($\pm 0,2$) ^{d*}	3,35 ($\pm 0,56$)
CR-Intervento	6,44 ($\pm 0,073$) ^A	9,4 ($\pm 0,1$) ^B	3,25 ($\pm 0,78$) ^A

Tabella 4.2 – Valori medi (\pm errore standard) di tenore idrico, pH, carbonio organico dei suoli sottoposti ad interventi di ingegneria naturalistica (TS, trapianti e semine; RG, rilevato a ginestre; SS, palificata di sottoscarpa; CR, palificata di controripa) e di suoli adiacenti, utilizzati come controllo, non sottoposti ad interventi. Lettere diverse in apice ai valori medi indicano differenze significative tra i suoli utilizzati come controllo (lettere minuscole), tra i suoli sottoposti ad intervento (lettere maiuscole) e tra questi ultimi ed i relativi controlli (asterischi).

Il suolo del rilevato a ginestre ha presentato invece valori di pH significativamente più bassi ($P < 0.05$) rispetto al suolo controllo. Il suolo della palificata di sottoscarpa ha presentato valori di pH significativamente maggiori rispetto al suolo controllo e agli altri suoli considerati, probabilmente a causa dell'aggiunta di materiale calcareo proveniente dallo scavo, miscelato con altro suolo prelevato nell'area del Parco. Sulla base dei valori di pH, i suoli studiati sono risultati molto diversi fra loro, appartenendo a diverse classi (Tab. 4.3). Come si può notare, per effetto del trattamento di rilevato a ginestre il suolo da subalcalino è diventato subacido, mentre per effetto dell'intervento di palificata di sottoscarpa il suolo da neutro è diventato alcalino.

Sito	pH	Classe
<u>Trapianti e semine</u>		
Controllo	6.78	Suolo neutro (6.7-7.2)
Trattato	6.71	Suolo neutro (6.7-7.2)
<u>Rilevato a ginestre</u>		
Controllo	7.34	Suolo subalcalino (7.3-8.1)
Trattato	6.37	Suolo subacido (6.0-6.7)
<u>Palificata di sottoscarpa</u>		
Controllo	6.91	Suolo neutro (6.7-7.2)
Trattato	8.15	Suolo alcalino (8.2-8.8)
<u>Palificata di controripa</u>		
Controllo	6.56	Suolo subacido (6.0-6.7)
Trattato	6.44	Suolo subacido (6.0-6.7)

Tab. 4.3. Valori di pH dei suoli e relativa classificazione secondo Sequi (1993)

Il tenore idrico del suolo trattato con palificata di sottoscarpa è risultato significativamente diverso da tutti gli altri suoli, mostrando valori intorno al 19%, ossia da due a tre volte superiori rispetto a quelli misurati nelle altre situazioni sperimentali (Tab. 4.2). Il tenore idrico dei suoli trattati è risultato maggiore di quello dei relativi controlli, oltre che per il trattamento di palificata di sottoscarpa, anche nel caso degli interventi di trapianti e semine e di palificata di controripa. Il suolo del rilevato a ginestre ha presentato, invece, un tenore idrico significativamente minore rispetto al controllo.

I suoli considerati hanno presentato un contenuto di C organico estremamente variabile (1-16 g kg⁻¹; Tab. 4.2). Il suolo trattato con palificata di sottoscarpa ha presentato un contenuto di C organico tre volte maggiore di quello del suolo controllo e significativamente maggiore rispetto a quello misurato in tutti gli altri siti. Il contenuto di carbonio organico non è risultato influenzato significativamente dagli altri interventi considerati. Il contenuto di carbonio organico è risultato correlato positivamente e significativamente al pH e al tenore idrico (Tab.4.4).

pH								
T.idrico %	0,840***							
Corg	0,858***	0,940***						
Cmic	-0,185	0,017	-0,010					
RB	-0,516**	-0,191	-0,275	0,507*				
qCO₂	-0,408*	-0,186	-0,181	-0,082	0,696***			
CEM	-0,625**	-0,482*	-0,617**	-0,016	0,525**	0,428*		
CE	-0,373	-0,533**	-0,445*	0,305	-0,145	-0,286	-0,173	
IMR	0,774***	0,605**	0,659***	0,121	-0,611**	-0,610**	-0,675***	0,003
	pH	Tenore idrico %	Corg	Cmic	RB	qCO₂	CEM	CE

Tabella 4.4 - Coefficienti di correlazione lineare di Pearson tra i parametri considerati (* = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001; n = 24)

La biomassa microbica non è risultata statisticamente differente nei suoli studiati, sebbene nel suolo soggetto all'intervento di palificata di controripa sia stato osservato un lieve aumento rispetto al controllo (Fig. 4.3). Il suolo soggetto all'intervento di palificata di sottoscarpa ha invece mostrato valori di biomassa microbica minori rispetto al relativo controllo.

Le misure di respirazione basale (Fig. 4.2) hanno evidenziato valori simili per i suoli soggetti ad interventi rispetto ai relativi controlli; solo nel rilevato a ginestre sono stati osservati valori di respirazione basale più elevati rispetto al controllo, ma con differenze non significative; mentre nel suolo con trattamento di palificata di sottoscarpa la respirazione è risultata minore del suolo controllo. Il quoziente metabolico (qCO₂) non è risultato influenzato dagli interventi (Fig. 4.2). Al contrario il coefficiente di mineralizzazione endogena è risultato significativamente maggiore nel suolo del rilevato a ginestre che nel relativo controllo, mentre il suolo trattato con palificata di sottoscarpa ha presentato valori più bassi, non solo rispetto al proprio controllo, ma anche rispetto a tutti gli altri suoli considerati (Fig. 4.2).

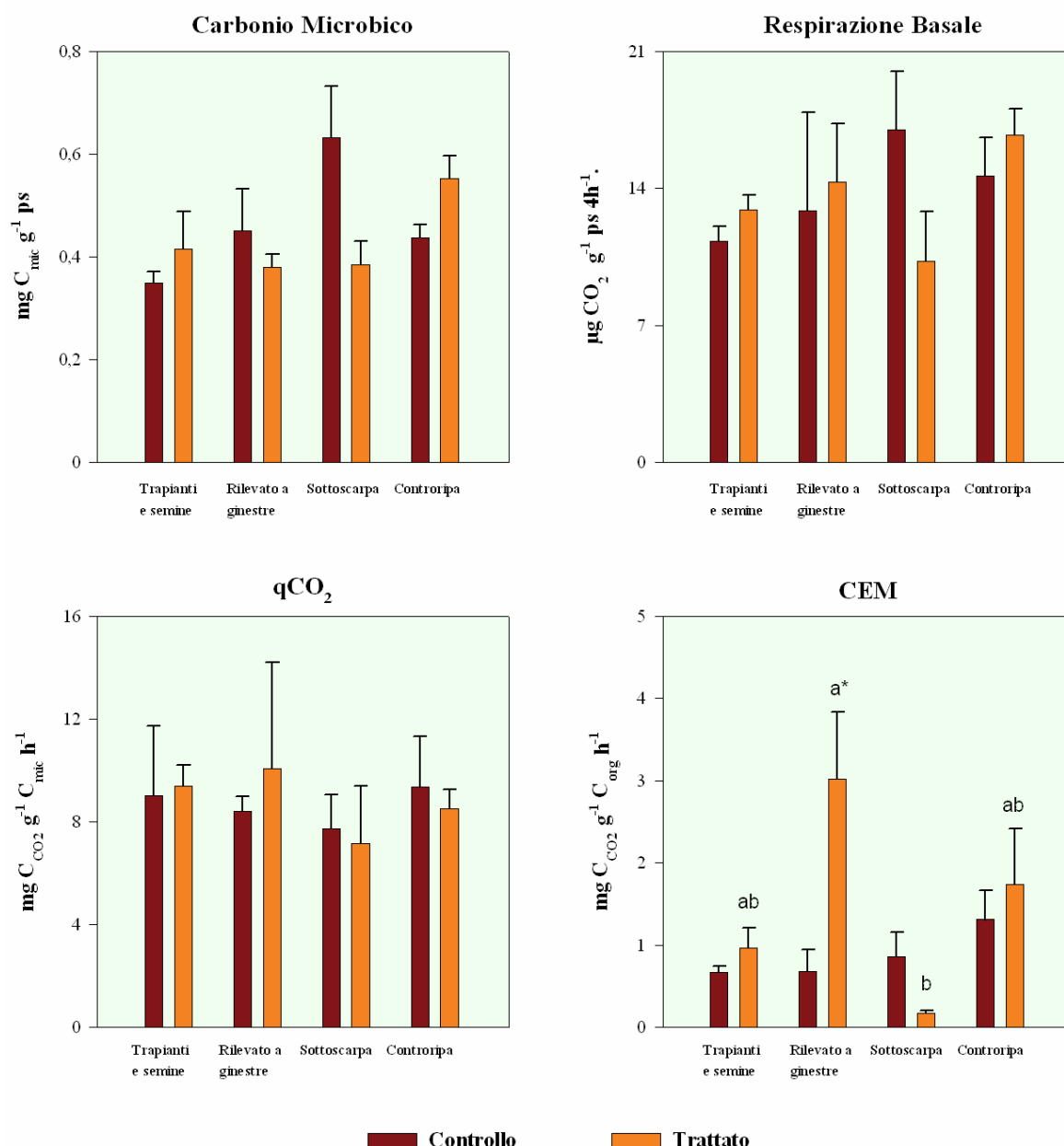


Fig. 4.3 – Valori medi (\pm errore standard) di carbonio microbico, respirazione basale, quoziente metabolico (qCO_2) e coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM) in suoli sottoposti ad interventi di ingegneria naturalistica (trapianti e semine, rilevato a ginestre, palificata di sottoscarpa, palificata di contorripa) e di suoli adiacenti utilizzati come controllo, non sottoposti ad interventi. Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative tra i suoli utilizzati come controllo (lettere minuscole), tra i suoli sottoposti ad intervento (lettere maiuscole) e tra questi ultimi ed i relativi controlli (asterischi).

Nei suoli studiati l'indice di omogeneità catabolica o catabolic evenness (CE, Fig. 4.3) ha assunto valori variabili tra 9 (nel suolo trattato con palificata di sottoscarpa) e 16 (nel suolo soggetto a trapianti e semine). Il suolo sottoposto all'intervento di palificata di sottoscarpa (Fig. 4.3) ha presentato valori più bassi dell'indice di omogeneità catabolica rispetto al suolo controllo (Fig. 4.3); mentre i suoli soggetti agli altri trattamenti non hanno mostrato

differenze rispetto ai relativi controlli. Dall'osservazione delle impronte cataboliche (Fig. 4.3) si evince che i suoli soggetti a trapianti e semine e alla palificata di controripa non hanno subito modifiche rilevanti rispetto ai relativi controlli. Inoltre gli incrementi medi di respirazione (IMR, Fig. 4.3) dei suoli soggetti a trapianti e semine ($0,027 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ p.s. } 4\text{h}^{-1}$) e alla palificata di controripa ($0,017 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ p.s. } 4\text{h}^{-1}$) non hanno mostrato differenze significative rispetto ai relativi controlli (rispettivamente $0,026 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ p.s. } 4\text{h}^{-1}$ e $0,019 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ p.s. } 4\text{h}^{-1}$). Molto diverse risultano invece le impronte cataboliche del rilevato a ginestre, rispetto al proprio controllo (Fig. 4.3), con valori di incremento respiratorio medio (IMR, Fig. 4.3) più basso nel suolo trattato ($0,010 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ p.s. } 4\text{h}^{-1}$) rispetto al controllo ($0,040 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ p.s. } 4\text{h}^{-1}$) e con un minore numero di risposte respiratorie all'aggiunta dei diversi substrati (19 contro 25 nel controllo). Analogamente sono risultati molto diversi i profili ottenuti per il suolo trattato con palificata di sottoscarpa e il proprio controllo, con incremento medio di respirazione (IMR, Fig. 4.3) più alto nel suolo sottoposto ad impianto ($0,059 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ p.s. } 4\text{h}^{-1}$) che nel suolo controllo ($0,038 \text{ mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ p.s. } 4\text{h}^{-1}$) ed un maggior numero di risposte respiratorie nel suolo trattato (25) rispetto al controllo (22).

In tutti i casi analizzati sono state osservate risposte respiratorie particolarmente basse, se non assenti, in relazione all'aggiunta dei substrati appartenenti al gruppo di amminoacidi e di carboidrati, mentre decisamente più alte sono state le risposte ottenute somministrando i substrati appartenenti al gruppo di acidi carbossilici (Fig. 4.3). Inoltre, per tutti i siti esaminati, l'acido L – glutammico è, nell'ambito degli amminoacidi, quello che ha mostrato una risposta maggiore (circa tre volte superiore rispetto agli altri).

4.2.5 Discussione

Nonostante gli interventi di ingegneria naturalistica siano stati realizzati solo poco tempo (da 2 mesi a 2 anni) prima del prelievo di suolo effettuato per questo lavoro, essi hanno prodotto alcuni effetti positivi sul suolo. In particolare, in tre trattamenti (trapianti e semine, palificata di sottoscarpa e palificata di controripa) è stato misurato un incremento del tenore idrico rispetto ai relativi controlli. Il contenuto di C organico è risultato significativamente aumentato solo nell'intervento di palificata di sottoscarpa. La comunità microbica è apparsa diversamente influenzata nei differenti trattamenti: il trattamento di palificata di controripa è l'unico che ha determinato un aumento, sebbene non

significativo, della biomassa microbica. Il rilevato a ginestre ha indotto un aumento, anche in questo caso non significativo, della respirazione basale, anche se a tale aumento è associato un incremento della velocità di mineralizzazione del C organico (CEM) e questo spiega il fatto che in questo suolo sia stata osservata la più bassa quantità di C organico tra i suoli considerati. L'intervento di rilevato a ginestre ha determinato anche una riduzione del numero di risposte positive all'aggiunta di substrati e una riduzione dell'incremento medio di respirazione. Il trattamento di palificata di sottoscarpa, pur avendo determinato una riduzione, seppure non significativa, di biomassa microbica, respirazione e indice di diversità funzionale, rispetto al controllo, ha indotto una riduzione del CEM con effetti positivi sul C organico, che infatti in questo suolo ha presentato i valori più alti in assoluto. Inoltre l'impronta catabolica del suolo trattato con palificata di sottoscarpa è risultata caratterizzata da un maggior numero di risposte positive all'aggiunta di substrati e da un maggior incremento medio di respirazione, suggerendo che la comunità microbica del suolo trattato sia più differenziata ed abbia migliori prestazioni nella degradazione di substrati semplici. Il suolo sottoposto a trapianti e semine ha presentato solo un lieve incremento, rispetto al controllo, dell'indice di uniformità catabolica.

La maggior parte dei suoli studiati ha mostrato comunque valori ancora bassi di C organico (0,1-0,6%), corrispondenti a valori di 0.2-1.0% di sostanza organica, e quindi ad una riserva di sostanza organica da molto bassa (<0.5%), come nel rilevato a ginestre, a bassa (0.5-1.0 %), negli altri suoli, secondo la classificazione di Soil Conservation Service (Russell, 1994). Questo risultato è coerente con la ridotta copertura vegetale e con la elevata pendenza dei siti, che determina un alto grado di erosione del suolo e quindi scarso accumulo di sostanza organica. Soltanto il suolo trattato con palificata di sottoscarpa è caratterizzato da un contenuto relativamente alto di C organico (1,6%) corrispondente ad un contenuto medio di sostanza organica (2-4%; Russell, 1994). Analogamente Schipper e collaboratori (2001), in uno studio condotto su suoli vulcanici della Nuova Zelanda caratterizzati da uno stadio successionale precoce, hanno misurato valori di carbonio organico, biomassa microbica e indice di omogeneità catabolica simili a quelli misurati nei nostri suoli.

La comunità microbica dei suoli trattati, pur rispondendo abbastanza ai trattamenti è comunque risultata ancora poco diversificata, presentando valori dell'indice di omogeneità catabolica non più alti di 16, considerando che tale indice può assumere come valore massimo 25. Degens et al. (2000) considerano i valori dell'indice di omogeneità catabolica inferiori a 18 indicativi di una scarsa qualità della sostanza organica, mentre considerano

valori superiori a 21 indicativi di suoli con una dotazione di sostanza organica qualitativamente migliore. La bassa diversità funzionale può essere spiegata dai bassi contenuti di sostanza organica nel suolo. Infatti, secondo Grime (1979) ad una bassa disponibilità di carbonio corrisponde una bassa diversità microbica (e quindi una bassa *evenness*), poiché in tal caso le comunità edafiche sono dominate soltanto dai microrganismi che riescono ad utilizzare la ridotta quantità di carbonio disponibile.

4.3 Conclusioni

L'intervento di palificata di sottoscarpa è quello che ha determinato il più marcato miglioramento della qualità del suolo, presentando valori più elevati di tenore idrico del suolo e di contenuto in C organico, maggiore risposta della comunità microbica all'aggiunta di substrati e una minore tendenza a perdere il C organico (basso CEM). I trattamenti di palificata di controripa e di rilevato a ginestre hanno comunque determinato dei lievi miglioramenti della qualità del suolo. Il primo infatti ha presentato un aumento del tenore idrico e della biomassa microbica. Il rilevato a ginestre ha prodotto un aumento di respirazione potenziale. Anche il trattamento a trapianti e semine, avvenuto solo 2 mesi prima del campionamento di suolo, ha prodotto un lieve miglioramento della qualità del suolo, presentando valori più elevati, rispetto al controllo, di tenore idrico e di indice di omogeneità catabolica. In ogni caso il limitato periodo di tempo intercorso tra la realizzazione dei trattamenti ed il prelievo di suolo (massimo 2 anni) probabilmente non ha fatto emergere differenze significative, ma il fatto che la comunità microbica abbia già cominciato a mostrare una risposta lascia ipotizzare che con il trascorrere del tempo tale risposta possa diventare più marcata.

CAPITOLO V

EFFETTO DEL CICLO VITALE DI PIANTE ERBACEE SULLA MICROFLORA DI SUOLI SOGGETTI AD INCENDI

5.1 PREMESSA

Nel bacino del Mediterraneo il disturbo antropico (deforestazione, pascolo, agricoltura e gestione del fuoco) e le caratteristiche climatiche di quest'area, hanno plasmato il paesaggio e la vegetazione. Il fuoco, in particolare, costituisce in questi ambienti una perturbazione ricorrente, sia di origine naturale che antropica. L'elevata frequenza degli incendi nell'area mediterranea non consente alla vegetazione di raggiungere lo stadio maturo, favorendo la presenza di arbusti e piante erbacee rispetto alle specie arboree. Incendi che si succedono con frequenza elevata tendono a deviare il sistema dal recupero dello stato originario e a creare un assetto diverso della vegetazione. Successivamente agli incendi si riconoscono infatti due fasi (De Lillis, 1995): nella prima si assiste al declino delle capacità rigenerative dalle gemme ipogee delle specie legnose in seguito alla brusca diminuzione del flusso di prodotti fotosintetici dalle foglie alle radici; la distruzione delle parti aeree e l'assenza di un periodo adeguato di ricrescita causano uno sfruttamento eccessivo delle riserve radicali. Nella seconda fase, la mancata copertura del suolo da parte delle fanerofite favorisce l'ingresso nella comunità di specie erbacee, annuali e perenni, caratterizzate da richieste energetiche meno elevate e un turnover più rapido: vengono così favorite le specie a ciclo vitale più breve. Attraverso queste fasi, che presentano una parziale sovrapposizione temporale, dalla struttura chiusa, monostratificata della macchia si passa ad una vegetazione a mosaico, con struttura pluristratificata, in cui elementi legnosi ed erbacei contribuiscono in uguale misura. In genere le condizioni ecologiche che seguono l'incendio favoriscono specie colonizzatrici, come varie graminacee, specie ruderali, ecc. (Bullini et al., 1998). L'elevata abbondanza e diversità di specie erbacee annuali che caratterizza il chaparral californiano, ad esempio, è dovuta proprio all'elevata frequenza di incendi che si verifica in questa zona a clima mediterraneo, in quanto il ciclo vitale delle piante annuali è legato strettamente agli incendi.

L'ambiente mediterraneo, oltre ad essere soggetto ad incendi, è limitato da una marcata aridità stagionale. Mentre gli alberi e gli arbusti sclerofilli tollerano l'aridità, le piante erbacee di ambiente mediterraneo sopravvivono alla stagione arida attuando una strategia di evitanza: nelle piante erbacee perenni in estate muore la parte epigea e sopravvive solo la porzione ipogea, dalla quale in inverno o in primavera si sviluppa la biomassa aerea; le piante erbacee annuali invece si riproducono alla fine dell'inverno o in primavera, in estate muoiono lasciando solo il seme (Venturelli e Virli, 1995). Nelle piante annuali i semi germinano in settembre/ottobre, con l'arrivo delle prime piogge autunnali; la crescita

vegetativa è massima in primavera, dunque si ha, gradualmente, la fioritura e, con il sopraggiungere della stagione arida, la fruttificazione e la disseminazione e infine la morte della piante. In altre specie invece la dormienza del seme si prolunga fino a febbraio/marzo dell'anno successivo a quello in cui il seme è stato prodotto; il periodo vegetativo di queste piante dura solo 2-3 mesi, come nel caso di *Erophila verna*, *Arabidopsis thaliana*, *Cardamine irsuta*, *Clypeola johnthlapsi*, ecc.

Studi precedenti sulla comunità edafica effettuati in area mediterranea hanno focalizzato l'attenzione sul suolo coperto dalle specie arbustive, in particolare *Quercus ilex* L., *Phillyrea angustifolia* L. e *Cistus* sp.pl. (Rutigliano et al., 2004), che rappresentano una fase evolutiva successiva a quella costituita dalle specie erbacee pioniere; non ci sono dati riguardanti le caratteristiche della microflora dei suoli predominati da specie erbacee. In questo studio sono state osservate, le variazioni di biomassa, attività e diversità funzionale della comunità microbica del suolo nel corso dello sviluppo della comunità erbacea dallo stadio di seme (marzo), a quello di plantula (aprile), a quello di pianta adulta (maggio) fino alla morte della parte epigea (luglio), in un'area di macchia mediterranea che era stata sottoposta, il 3 luglio 2000, ad incendi sperimentali di diversa intensità. La strategia di campionamento è stata programmata tenendo conto della storia pregressa dei siti di campionamento e cioè conservando la distinzione tra suoli non incendiati, suoli interessati da incendio leggero e suoli interessati da incendio intenso. Questi esperimenti hanno avuto lo scopo di stabilire se la comunità microbica fosse influenzata dal ciclo vitale delle piante erbacee e se, a distanza di cinque anni dalla realizzazione degli incendi sperimentali, le caratteristiche della comunità edafica differissero a seconda della storia pregressa del suolo. Questo studio si è svolto nell'ambito del Progetto finanziato nel 2003 dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca dal titolo “*Analisi modellistica dei flussi di C e N in macchia mediterranea: influenza della variabilità spaziale della copertura vegetale*”.

5.2 MATERIALI E METODI

5.2.1 Area di studio

I campionamenti sono stati effettuati all'interno della Riserva Naturale di Castel Volturno (CE), istituita nel 1977 (Fig. 5.1); essa include una stretta fascia del litorale settentrionale campano, compresa tra la foce dei Regi Lagni a nord, la foce del lago Patria a sud e la statale Domitiana ad est. La Riserva ha un'estensione di 268 ha ed è attraversata da una serie di viali che la percorrono perpendicolarmente e collegano la Domitiana agli stabilimenti balneari del litorale.



Figura 5.1 - Collocazione geografica della Riserva Naturale di Castel Volturno (CE).

In passato la vegetazione di questo territorio è stata utilizzata per il pascolo intensivo e, fino agli anni '30, alla produzione di legname. Nel 1955 sono state sospese tutte le attività di sfruttamento del territorio ed è stato avviato un programma di riforestazione con pini (*P. halepensis* Miller, *P. pinea* L., *P. pinaster* Aiton). Attualmente le uniche attività consentite sono la raccolta di strobili e gli interventi di riforestazione delle aree incendiate ed altri

interventi di gestione ad opera del Corpo Forestale dello Stato, mirati alla prevenzione degli incendi. Il litorale è interessato da frequenti incendi di origine dolosa, che si verificano soprattutto nei mesi estivi. La prevenzione di incendi dolosi viene attuata mediante taglio periodico della vegetazione ed eliminazione della sostanza organica secca per ridurre l'accumulo di combustibile.

Questa Riserva è una delle poche aree del litorale campano che conserva una vegetazione mediterranea ancora relativamente intatta. La zona meno sfruttata è quella della macchia bassa in prossimità del mare, dove è stata preservata la vegetazione per la sua azione frangivento e stabilizzatrice sulle dune.

Secondo la carta vegetazionale redatta da Buonanno et al. (1993), la Riserva presenta due formazioni distinte: una fascia a macchia mediterranea, prospiciente il mare, rappresentata da specie quali *Quercus ilex* L., *Myrtus communis* L., *Arbutus unedo* L., *Pistacea lentiscus* L., *Phyllirea* sp. pl. (Esposito et al., 1999) ed una pineta di impianto antropico nell'area più vicina alla S.S. Domitiana, rappresentata da diverse specie di pini (*P. halepensis* Miller, *P. pinaster* Aiton e *P. pinea* L.), che sono stati piantati dai forestali nelle aree lasciate vuote dagli incendi. La copertura legnosa della macchia è localmente interrotta da aree aperte in cui la vegetazione è costituita da pratelli xerofili rappresentati prevalentemente da circa 80 specie di graminacee tra cui *Lagurus ovatus* e leguminose quali *Trifolium scabrum*, *Medicago litoralis* e *Melilotus neapolitana*.

Il suolo della Riserva è prevalentemente sabbioso, con netta predominanza della sabbia grossa sulla fine e con assenza di scheletro (Calcaric Arenosol, FAO, 1998).

Il clima è di tipo mediterraneo con estati calde e secche, abbondanti precipitazioni piovose e temperature sostanzialmente miti nel periodo invernale.

Il 3 luglio 2000, all'interno della Riserva, sono stati effettuati incendi controllati di diversa intensità (Fig. 5.2), utilizzando, in accordo con quanto riportato da Molina & Llinares (1998), diverse quantità di combustibile. Gli incendi sperimentali hanno interessato un'area coperta da tipica vegetazione mediterranea a macchia bassa, caratterizzata da fillirea (*Phyllirea angustifolia* L.), lentisco (*Pistacea lentiscus*), mirto (*Myrtus communis*), leccio (*Quercus ilex*), cisto (*Cistus incanus* L., *monspeliensis* L., e *salvifolius* L.) ed i pratelli xerofili.

L'area complessiva è stata divisa in tre parcelle (A, B e C, fig. 5.2), ciascuna delle quali ulteriormente suddivisa in tre plot di 50 m² separate da corridoi privi di vegetazione di circa 5 m. Nell'ambito di ciascuna parcella un plot non è stato incendiato, un altro è stato sottoposto ad incendio leggero ed il terzo ad incendio intenso (Figura 5.2)

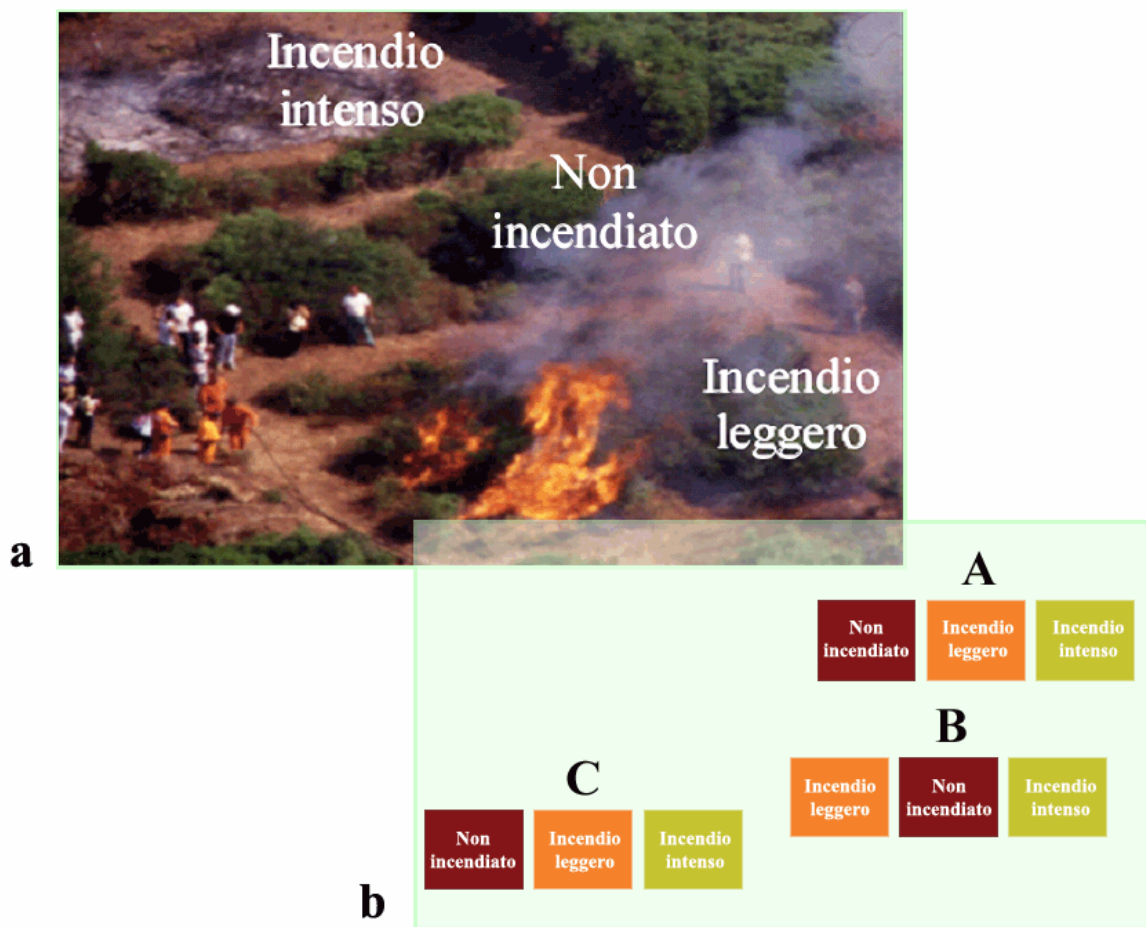


Figura 5.2 - a) Veduta aerea degli incendi sperimentali di diversa intensità (leggero ed intenso) realizzati nella Riserva Naturale di Castel Volturno il 3 luglio del 2000. b) Schema delle parcelle sperimentali.

Per effettuare l'incendio leggero è stata bruciata la vegetazione presente nell'area previamente sfoltita, in modo da ottenere una quantità di biomassa pari a 2 kg m^{-2} ; per effettuare l'incendio intenso, invece, è stato aggiunto alla vegetazione presente nell'area materiale legnoso tagliato dall'area immediatamente prospiciente (corridoi di contorno) in modo da avere 4 kg m^{-2} di biomassa (Fig. 5.3).

Il prelievo dei suoli coperti da pratelli, è stato eseguito nel periodo primaverile – estivo, in corrispondenza delle principali fasi del ciclo vitale delle specie erbacee e precisamente il 26 marzo, il 21 aprile, il 27 maggio ed il 1° luglio del 2004. Il suolo è stato prelevato nei nove plot soggetti a differente trattamento: tre plot che erano stati sottoposti ad incendio leggero, tre plot che avevano subito incendio intenso e tre plot non incendiati, dove evidentemente è stata successivamente tagliata la vegetazione arbustiva, lasciando spazi aperti colonizzati da piante erbacee (Fig. 5.4).



Fig. 5.3. - Materiale secco accatastato su di una parcella destinata ad incendio di elevata intensità



Figura 5.4 - Campionamento del suolo nelle aree colonizzate da pratelli xerofili.

5.2.2 Analisi del suolo

Sui campioni di suolo, prelevati in 6 repliche di campo per ciascun trattamento (controllo, incendio leggero, incendio intenso), sono state effettuate misure di parametri chimici (pH, tenore idrico, contenuto di C organico) e biologici (biomassa e attività microbica, risposta respiratoria all'aggiunta di substrati semplici, quoziente metabolico e coefficiente di mineralizzazione endogena), utilizzando i metodi descritti nel paragrafo 3.2.2.

5.2.3 Elaborazione statistica dei dati

Per ogni parametro sono stati calcolati la media e l'errore standard delle 6 repliche di campo. Mediante l'Analisi della Varianza ad una via, seguita da Student-Newman-Keuls test ($P < 0,05$) mediante il software Sigma Stat 1.0, sono state saggiate sia le differenze per ciascun parametro considerato e per ogni trattamento tra le diverse date di campionamento, sia le differenze tra i tre trattamenti (controllo, incendio leggero, incendio intenso). Le correlazioni tra i differenti parametri sono state saggiate mediante il coefficiente di Pearson (Sigma Stat 1.0).

5.3 RISULTATI

Il contenuto di carbonio organico dei suoli considerati non ha mostrato né variazioni stagionali né differenze tra suoli soggetti ad un diverso trattamento nel passato (incendio leggero, incendio intenso, non incendiato) (Tab. 5.1).

Campione	pH	Tenore idrico %	Carbonio Organico (g kg ⁻¹)
26/03/04			
Non incendiato	7,116 (± 0,087)	26,350 (± 3,456) ^a	56,689 (± 3,401)
Incendio leggero	7,479 (±0,188)	21,605 (± 1,935) ^{A*}	58,330 (± 5,194)
Incendio intenso	7,582 (±0,036) ^{a*}	16,794 (± 1,198) ^{a*}	40,091 (±8,513)
21/04/04			
Non incendiato	7,155 (±0,050)	23,803 (± 2,263) ^a	56,536 (±4,454)
Incendio leggero	7,345 (±0,042) [*]	20,810 (± 1,753) ^A	52,157 (±4,583)
Incendio intenso	7,476 (±0,005) ^{a*}	16,156 (± 3,975) ^{a*}	47,960 (±7,040)
27/05/04			
Non incendiato	7,157 (±0,112)	15,679 (±2,838) ^b	47,239 (± 5,680)
Incendio leggero	7,057 (±0,121)	14,868 (±1,602) ^B	52,808 (± 5,223)
Incendio intenso	7,121 (±0,035) ^β	13,805 (±2,988) ^{aβ}	44,953 (± 4,493)
01/07/04			
Non incendiato	7,100 (±0,149)	1,976 (± 0,091) ^c	44,353 (± 3,650)
Incendio leggero	7,073(±0,127)	2,103 (± 0,111) ^C	56,840 (± 9,544)
Incendio intenso	7,326 (±0,046) ^{aβ}	2,146 (±0,218) ^β	45,073 (± 3,620)

Fig. 5.1 – Valori medi (± errore standard) di pH, tenore idrico, carbonio organico in suoli soggetti ad incendio leggero ed incendio intenso nel luglio del 2000 e in un suolo non incendiato, prelevati in quattro fasi dello sviluppo delle piante erbacee: seme (26/03/04), plantula (21/04/04), pianta adulta (27/05/04), morte della pianta (01/07/04). Lettere diverse in apice ai valori medi indicano differenze significative tra le diverse date di campionamento per il suolo non incendiato (lettere minuscole), il suolo soggetto ad incendio leggero (lettere maiuscole) o il suolo soggetto ad incendio intenso (lettere greche). Differenze significative tra suoli incendiati e suolo non incendiato o tra suoli soggetti ad incendi di diversa intensità sono indicati rispettivamente da asterischi o cerchi.

Il tenore idrico ha invece presentato una marcata dinamica stagionale, con valori progressivamente più bassi da marzo a luglio (Tab. 5.1), con differenze sempre significative tra i diversi campionamenti. I suoli che hanno subito incendi 4 anni prima del campionamento hanno mostrato valori di tenore idrico più bassi del suolo non incendiato nel campionamento di marzo, e, nel caso del suolo soggetto ad incendio intenso, anche nel campionamento di aprile.

Il pH ha presentato variazioni stagionali solo nel caso del suolo interessato da incendio intenso, con valori significativamente più elevati a marzo e aprile rispetto a maggio (Tab.

5.1). Un incremento di pH nei suoli incendiati, rispetto al suolo non incendiato, è stato osservato nei primi due campionamenti.

La biomassa microbica ha presentato una marcata dinamica stagionale, caratterizzata da una drastica riduzione a luglio, in corrispondenza con l'aridità estiva e con la morte della parte epigea per la copertura vegetale considerata (Fig. 5.5).

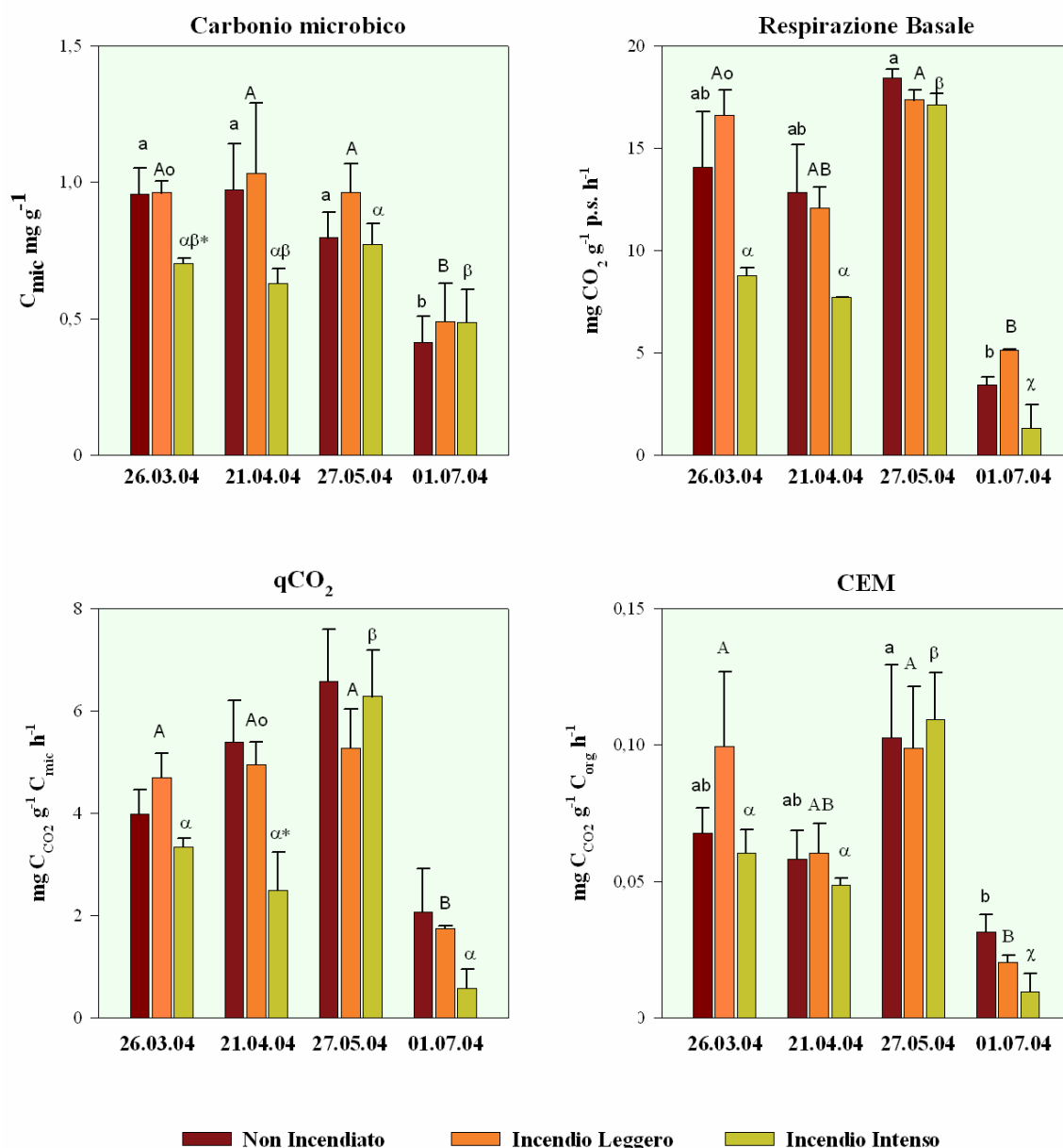


Fig. 5.5 – Valori medi (+ errore standard) di carbonio microbico, respirazione basale, quoziente metabolico (qCO₂) e coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM) in suoli soggetti ad incendio leggero ed incendio intenso nel luglio del 2000 e in un suolo non incendiato, prelevati in quattro fasi dello sviluppo delle piante erbacee: seme (26/03/04), plantula (21/04/04), pianta adulta (27/05/04), morte della pianta (01/07/04). Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative tra le diverse date di campionamento per il suolo non incendiato (lettere minuscole), il suolo soggetto ad incendio leggero (lettere maiuscole) o il suolo soggetto ad incendio intenso (lettere greche). Differenze significative tra suoli incendiati e suolo non incendiato o tra suoli soggetti ad incendi di diversa intensità sono indicati rispettivamente da asterischi o cerchi.

Sia nel suolo sottoposto ad incendio leggero che nel suolo non incendiato la biomassa microbica ha mostrato valori significativamente più elevati nei prelievi di marzo, aprile e maggio che nel prelievo di luglio. Il suolo interessato da incendio intenso (I) ha invece mostrato soltanto a maggio valori di biomassa microbica significativamente più elevati rispetto ai suoli prelevati a luglio. Nel campionamento di marzo la biomassa microbica è risultata più bassa nel suolo soggetto ad incendio intenso che nei suoli soggetti agli altri due trattamenti (incendio leggero e non incendiato).

Per ciascun suolo considerato (NI, L, I), la respirazione basale ha raggiunto un picco a maggio, diminuendo significativamente nella stagione più arida (Fig. 5.5), analogamente alla biomassa microbica. Il suolo non incendiato e il suolo sottoposto ad incendio leggero hanno presentato anche a marzo e ad aprile valori di respirazione significativamente più elevati che a luglio. Mentre i suoli sottoposti ad incendio intenso hanno presentato a maggio valori significativamente più elevati anche rispetto ai suoli prelevati a marzo e ad aprile, che sono risultati simili a quelli campionati a luglio. La respirazione è risultata più bassa nel suolo soggetto ad incendio intenso che nei suoli soggetti agli altri due trattamenti nei campionamenti di marzo e di aprile.

Anche il quoziente metabolico (qCO_2) ha mostrato una dinamica stagionale molto marcata con un andamento crescente da marzo a maggio ed un forte calo a luglio, per quasi tutte le situazioni sperimentali (Fig. 5.5). Le differenze osservate tra i diversi campionamenti non sono tuttavia risultate significative per il suolo non incendiato, mentre per il suolo sottoposto ad incendio leggero il qCO_2 è risultato significativamente più basso a luglio che in tutte le altre date di campionamento, e per il suolo soggetto ad incendio intenso esso è risultato significativamente più elevato a maggio che nelle altre date di campionamento. Solo nel campionamento di aprile i valori di qCO_2 sono risultati influenzati dal tipo di trattamento, mostrando valori più bassi nel sito soggetto ad incendio intenso.

Anche il coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM) ha presentato i valori più bassi a luglio ed i più elevati a maggio, per tutte e tre le situazioni sperimentali (Fig. 5.5). I valori di CEM sono significativamente più elevati a maggio che a luglio sia per il suolo non incendiato che per i suoli che hanno subito incendi sperimentali. Il suolo sottoposto ad incendio intenso ha assunto a maggio valori di CEM più elevati oltre che rispetto a luglio, anche rispetto alle altre due date di campionamento. Per quanto riguarda il CEM i suoli soggetti a differente trattamento (non incendiato, incendio leggero ed incendio intenso) non hanno mai mostrato differenze significative nell'ambito di ciascun campionamento.

Biomassa microbica, respirazione basale, qCO_2 e CEM sono risultati correlati positivamente con il tenore idrico (Tab. 5.2).

pH								
T.idrico %	0,071							
Corg	-0,236*	0,297*						
Cmic	-0,139	0,610***	0,101					
RB	-0,061	0,421***	0,085	0,754***				
qCO ₂	-0,089	0,364**	0,107	0,323*	0,812***			
CEM	0,052	0,406**	-0,260	0,594***	0,808***	0,627***		
CE	-0,449***	0,044	0,269*	0,089	-0,043	-0,071	0,014	
IMR	0,287*	0,222	-0,022	0,052	-0,249	-0,244	0,102	-0,071
	pH	Tenore idrico %	Corg	Cmic	RB	qCO ₂	CEM	CE

Tabella 5.2 - Coefficienti di correlazione lineare di Pearson tra i parametri considerati.
(* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; $52 < n < 72$)

Per quanto riguarda le impronte cataboliche, il gruppo degli acidi carbossilici ha determinato risposte respiratorie generalmente più elevate sia rispetto al gruppo degli aminoacidi che a quello dei carboidrati (Fig. 5.6), in particolare nel suolo sottoposto ad incendio intenso. Tale suolo ha presentato, nei primi due campionamenti, anche una ridotta omogeneità della distribuzione dell'attività catabolica, con indici di omogeneità catabolica (catabolic evenness, CE, Fig. 5.6) più bassi, rispetto al suolo che ha subito l'incendio leggero e al suolo non incendiato. Non sono state osservate invece variazioni significative dell'indice di omogeneità catabolica nelle diverse date di campionamento per ciascun trattamento. L'indice di omogeneità catabolica è risultato correlato negativamente con il pH e positivamente con il contenuto di C organico (Tab. 5.2).

L'incremento respiratorio medio (IMR, Fig. 5.6) dovuto all'aggiunta dei differenti substrati è risultato significativamente più elevato, in tutti i campionamenti, nel suolo soggetto ad incendio intenso, mentre i valori più bassi si riferiscono al suolo controllo.

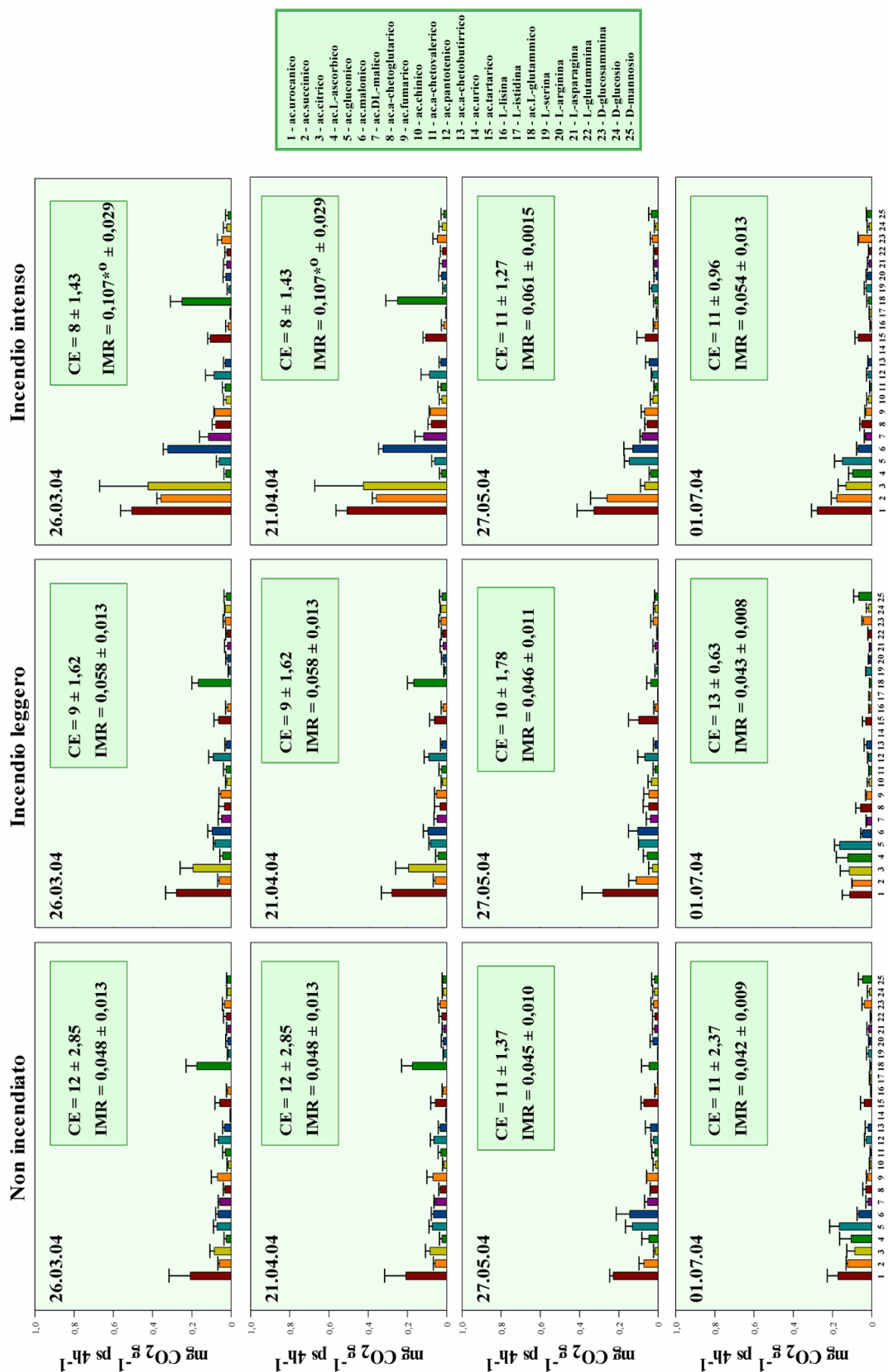


Fig. 5.6 — Profili di risposta catabolica, misurati come incremento dell'evoluzione di CO_2 ($mg\ CO_2\ g^{-1}\ ps\ 4h^{-1}$), dei suoli soggetti ad incendio leggero ed incendio intenso nel luglio del 2000 e in un suolo non incendiato, prelevati in quattro fasi dello sviluppo delle piante erbacee: seme (26/03/04), piantula (21/04/04), pianta adulta (27/05/04), morte della pianta (01/07/04). In alto a destra sono riportati i valori degli indici di uniformità catabolica ($CE \pm$ errore standard) e degli incrementi medi di respirazione ($IMR \pm$ errore standard) dovuti all'aggiunta dei 25 substrati. Lettere diverse in apice ai valori di CE e IMR indicano differenze significative tra le diverse date di campionamento per il suolo non incendiato (lettere minuscole), il suolo soggetto ad incendio leggero (lettere maiuscole) o il suolo soggetto ad incendio intenso (lettere greche). Differenze significative tra suoli incendiati e suolo non incendiato o tra suoli soggetti ad incendi di diversa intensità sono indicati rispettivamente da asterischi o cerchi.

5.4 DISCUSSIONE

Le variabili ambientali considerate in questo studio (aridità stagionale, ciclo della vegetazione, storia pregressa dei siti legata agli incendi) hanno influenzato le caratteristiche chimiche e biologiche dei suoli in esame.

Tra i parametri chimici, il tenore idrico ha mostrato una dinamica strettamente legata alle stagioni, assumendo valori che diminuiscono progressivamente da marzo a luglio. I suoli sottoposti ad incendi hanno mostrato nei primi due campionamenti (corrispondenti allo stadio di seme e a quello di plantula) valori più bassi di tenore idrico rispetto al suolo non incendiato. Questo potrebbe far pensare ad un effetto del fuoco protratto nel tempo, che avrebbe causato nei suoli percorsi dal fuoco l'instaurarsi di condizioni idrofobiche; la formazione di uno strato idrofobico impedirebbe all'acqua di attraversare lo strato superficiale del suolo per giungere più in profondità, determinando nel suolo un decremento della capacità di riumidificazione ed un aumento di erosione, con conseguenti cambiamenti anche dell'attività microbica (Letey, 2001). Tuttavia secondo Franco et al. (2000) le condizioni idrofobiche indotte dal fuoco non sono permanenti, ma svaniscono dopo un anno o due dal passaggio del fuoco, in seguito alla decomposizione delle cere e degli altri materiali idrofobici ad opera dei microrganismi (Franco et al., 2000), in effetti in questo studio la riduzione di tenore idrico nei suoli incendiati, rispetto al controllo, non si è osservata più negli ultimi due campionamenti.

Il carbonio organico non ha subito variazioni in relazione alla stagione di campionamento ed al tipo di trattamento subito in passato dal suolo. In effetti gli incendi sperimentali che hanno interessato tali suoli hanno determinato un incremento di carbonio organico dopo gli incendi per un periodo variabile a seconda dell'intensità dell'incendio, ed in particolare per un anno, nel caso dell'incendio leggero, e per una settimana, nel caso dell'incendio intenso (Rutigliano et al., 2002), dovuto all'apporto al suolo di parti delle piante uccise dal fuoco.

Esaminando la biomassa e l'attività microbica durante il periodo di osservazione si nota che esse hanno presentato, nel suolo sottoposto ad incendio intenso, un aumento da marzo a maggio, per poi ridursi e raggiungere i valori più bassi in assoluto a luglio. Anche l'indice di omogeneità catabolica è aumentato da marzo a maggio, ma non è diminuito a luglio. Tale dinamica potrebbe essere determinata, dal susseguirsi delle varie fasi del ciclo vitale delle piante erbacee, che a marzo e aprile si trovano allo stadio, rispettivamente, di seme e di plantula, a maggio raggiungono generalmente il massimo sviluppo ed a luglio perdono la parte epigea. L'aumento di attività e di biomassa microbica, può essere spiegato

dall'input di nutrienti fornito al suolo dalle piante, oltre che dall'innalzamento della temperatura nella stagione primaverile. All'aumento di respirazione corrisponde un pari aumento del coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM), ma non del contenuto in carbonio organico del suolo e questo dato può indicare che il suolo sottoposto ad incendio intenso, nonostante lo sviluppo dei pratelli xerofili, non riesce ad incrementare la riserva di carbonio organico. Anche per il quoziente metabolico è stato osservato un generale incremento da marzo a maggio, dovuto al fatto che all'aumento di respirazione non corrisponde un pari aumento di biomassa microbica; probabilmente la microflora dei suoli sottoposti ad incendio intenso investe le risorse disponibili più per far fronte a situazioni di stress, che per il proprio sviluppo. Newman et al. (in revisione) hanno riscontrato valori di quoziente metabolico più elevati in suoli di una foresta a Nord del Nuovo Messico (USA) soggetta ad incendi incontrollati che in suoli di foreste adiacenti non incendiate. D'altra parte, il fatto che nel suolo sottoposto ad incendio intenso i valori più bassi in assoluto di biomassa e attività microbica siano stati riscontrati a luglio, dimostra che anche la riduzione del contenuto idrico del suolo influisce negativamente sulla microflora edafica. Una dinamica completamente diversa dei parametri microbici è stata osservata nel suolo sottoposto ad incendio leggero e nel suolo non incendiato: la biomassa e l'attività microbica sono caratterizzati generalmente solo da una significativa riduzione estiva, suggerendo che in questi suoli l'acqua costituisca il principale fattore di regolazione della comunità microbica. Rispetto a tali suoli, il suolo soggetto ad incendio intenso ha presentato, nei due campionamenti che hanno preceduto il massimo sviluppo delle piante erbacee, valori più bassi di biomassa microbica, attività microbica e dell'indice di uniformità catabolica ed un'impronta catabolica completamente differente. Sugli stessi suoli analizzati in questo lavoro D'Ascoli et al. (2005) hanno riportato valori dell'indice di omogeneità catabolica della microflora edafica più bassi nei suoli incendiati che nel suolo non incendiato soltanto nella prima settimana dopo l'incendio e risposte respiratorie, indotte dall'aggiunta dei diversi substrati organici, più basse nei suoli sottoposti ad incendi rispetto al suolo non incendiato, anche ad un anno dagli incendi, con effetti più marcati nel caso dell'incendio intenso. I dati ottenuti in questo lavoro suggeriscono che solo il suolo soggetto ad incendio intenso risente ancora del disturbo avvenuto quattro anni prima. In questa situazione la comunità microbica ha ottenuto evidentemente un beneficio dallo sviluppo della vegetazione erbacea, cosa che invece non si è verificata negli altri due suoli che, già in partenza, si trovavano in migliori condizioni. Altri autori (Newman et al., in revisione) hanno riscontrato che nel suolo di una foresta a Nord del Nuovo Messico (USA)

soggetta ad incendi incontrollati la diversità funzionale dei funghi aumentava dopo il fuoco, mentre quella dei batteri diminuiva, rispetto a quella misurata nei suoli di foreste adiacenti non incendiate. Il fatto che il suolo sottoposto ad incendio intenso abbia presentato, nei primi due campionamenti, il più basso grado di equiripartizione dell'attività microbica tra tutte le attività cataboliche considerate (basso indice di omogeneità catabolica) indica che la comunità microbica di tale suolo è più vulnerabile ad ulteriori condizioni di disturbo o stress, come suggerito da Degens et al. (2001). Infatti i diversi parametri biologici misurati in questo suolo sono risultati più soggetti a fluttuazioni, legate sia alle condizioni di disponibilità idrica sia al ciclo vitale della pianta. Altri autori (Hart et al., 2005) hanno riportato che gli incendi possono avere effetti a lungo termine sulla microflora edafica, dovuti principalmente alle alterazioni causate dal fuoco sulla composizione della comunità vegetale. Infatti le differenti specie vegetali esercitano una sorta di controllo sulla comunità microbica, che dipende principalmente dalla quantità e la qualità di risorse prodotte, dalla competizione per i nutrienti e dall'instaurarsi di relazioni di mutualismo tra piante e microflora del suolo (Wardle, 2000). Secondo Bever (2003) il fuoco genera, nei suoli incendiati, un disturbo, condizioni di stress o il rilascio di sostanze specifiche che danno inizio a meccanismi di feedback tra piante e comunità microbica del suolo, che possono essere positivi o negativi. I cambiamenti della produttività primaria netta delle piante, dovuti agli effetti del fuoco sulla struttura della vegetazione, che possono essere diretti o indiretti, a breve o a lungo termine, possono influenzare sia la composizione che la biomassa della microflora edafica (Wardle, 2002). Le modificazioni indotte dal fuoco sulla vegetazione possono inoltre alterare le capacità di piante e microrganismi di competere per i nutrienti limitanti (Kaye e Hart, 1997) e questo può alterare di conseguenza la composizione della microflora edafica (Hart et al., 2005). I risultati ottenuti in questo lavoro confermano tali ipotesi, infatti le impronte cataboliche, che riflettono la struttura della comunità microbica, sono risultate, come si è detto, molto differenti, nei primi due campionamenti, nei suoli interessati da incendio intenso rispetto ai suoli sottoposti ad incendio leggero e nel suolo non incendiato.

La differenza tra le impronte cataboliche dei suoli sottoposti ad incendio intenso, prelevati nelle diverse date di campionamento, potrebbero riflettere le variazioni di pH dei suoli. Il pH è infatti considerato uno dei fattori più importanti nel determinare la struttura delle comunità microbiche del suolo. Batteri isolati hanno mostrato sia incrementi (Thompson et al., 1987) che decrementi (Kytöviita et al., 1990) nella capacità di metabolizzare differenti substrati in seguito all'acidificazione del suolo. Modificazioni della struttura delle

comunità microbiche in seguito a modificazioni del pH di suoli forestali sono state evidenziate mediante analisi del profilo degli acidi grassi dei fosfolipidi (PLFA, Bååth et al., 1992; Bååth et al., 1995; Frostegård et al., 1993). L'innalzamento del pH nel suolo può indurre un aumento dell'attività di alcuni microrganismi (Hart et al., 2005). Ad esempio Montes e Christensen (1979) hanno osservato che, aggiungendo calce a suoli forestali fino ad innalzare il pH di 0,5-1,7 unità, la nitrificazione netta, misurata in laboratorio, aumentava diverse volte. D'altra parte in questo studio l'attività microbica non è risultata correlata al pH del suolo.

I valori più elevati di pH nei suoli sottoposti ad incendio, rispetto al suolo non incendiato, non sembrano poter essere attribuiti al passaggio del fuoco, in quanto non sono stati generalmente osservati nel primo anno dopo gli incendi sperimentali (Rutigliano et al., submitted), anche se diversi autori hanno riportato che il fuoco può determinare un innalzamento del pH del suolo a causa della combustione di acidi organici indissociati e la riduzione di H^+ nel suolo (Fisher e Binkley, 2000).

L'azione del fuoco può modificare la struttura della comunità microbica a lungo termine anche a causa del calore prodotto (Hart et al., 2005). Alcuni gruppi di microrganismi sono più sensibili di altri al calore. Il fuoco può quindi causare in maniera selettiva la morte di differenti gruppi di microrganismi, portando ad un cambiamento della struttura della comunità microbica del suolo (Hart et al., 2005). Temperature di 80 e 60°C possono determinare il 100% di mortalità per i funghi in suoli rispettivamente aridi e umidi (Dunn et al., 1985). I batteri sono generalmente più resistenti al calore rispetto ai funghi. Le temperature alle quali si ha il 100% di mortalità per i batteri sono 120 °C in suoli secchi e 100 °C in suoli umidi (Dunn e DeBano, 1977). Diversi autori hanno riportato, inoltre, che i batteri appartenenti al gruppo *Nitrobacter* sp.pl. sono più sensibili al calore rispetto ai batteri eterotrofici, ma meno dei funghi (Dunn e DeBano, 1977; Dunn et al., 1985). Nell'ambito dei funghi, si riporta che quelli che formano associazioni micorriziche con piante erbacee di foreste situate a Inland (USA), sembrano essere più tolleranti al calore rispetto ai funghi asimbiotici (Klopatek et al., 1994). Gli stessi autori hanno riscontrato inoltre che il fuoco può avere un effetto a lungo termine sui funghi micorrizici, osservando che la biomassa di tali organismi misurata nei suoli incendiati, fino a 10 anni dopo l'incendio, era ancora inferiore rispetto a quella misurata nei suoli prelevati prima dell'incendio. In base a queste osservazioni si può supporre che il fuoco determini un incremento nel suolo dell'abbondanza relativa dei batteri rispetto ai funghi. Nei suoli studiati è stato effettivamente riportato da Rutigliano et al. (submitted) per circa due anni

dopo gli incendi sperimentali una riduzione della abbondanza relativa dei funghi nella comunità microbica totale, anche se tale effetto era attribuito dagli autori all'incremento di temperatura solo nel suolo soggetto ad incendio intenso, in quanto solo in tale suolo i funghi risultavano ridotti immediatamente dopo il fuoco. Fuller et al. (1955), in uno studio basato sulla coltura selettiva di popolazioni microbiche, hanno riscontrato questo aumento del rapporto tra batteri e funghi sia in suoli colpiti da incendi incontrollati, sia in suoli bruciati con incendi controllati, in una foresta di pini in Nord Arizona (USA).

Il fuoco può influenzare anche indirettamente l'attività della microflora edafica, determinando variazioni a lungo termine delle proprietà del suolo, ad esempio determinando la perdita contemporanea di C e N (Choromanska e DeLuca, 2002). Tuttavia sono più frequenti i casi in cui si osserva un incremento di nutrienti disponibili immediatamente dopo il fuoco, che può portare ad un incremento a breve termine dell'attività microbica (DeLuca e Zouhar, 2000; Choromanska e DeLuca, 2001), come è stato osservato nei suoli studiati nei primi 3 mesi dopo il passaggio del fuoco (Rutigliano et al., 2002).

5.5 CONCLUSIONI

L'effetto dello sviluppo di una comunità erbacea annua sulla microflora edafica è risultato legato al tipo di disturbo che ha determinato la distruzione della comunità arbustiva pre-esistente. Infatti nel suolo sottoposto ad incendio intenso la microflora edafica è caratterizzata dai valori più elevati di biomassa, attività e diversità in concomitanza con il massimo sviluppo delle piante erbacee e dai valori più bassi nel periodo arido che corrisponde anche alla morte delle piante, suggerendo che in tale periodo la microflora è risultata limitata sia dalla disponibilità idrica che dall'assenza di copertura vegetale. Al contrario nel suolo soggetto ad incendio leggero e nel suolo non incendiato, dove evidentemente lo sviluppo della comunità erbacea si è verificato in seguito al taglio della vegetazione arbustiva, è stato osservato soltanto un effetto limitante dell'aridità estiva sulla microflora edafica.

Il suolo interessato da incendio intenso sembra ancora risentire dell'effetto del fuoco, infatti nei primi due campionamenti esso è risultato caratterizzato da una comunità microbica meno sviluppata, attiva e diversificata da un punto di vista funzionale, rispetto a quella del suolo trattato con incendio leggero e del suolo non incendiato, tuttavia in corrispondenza del massimo sviluppo delle piante la comunità microbica ha mostrato un recupero, non risultando più differente da quella dei suoli sottoposti agli altri due trattamenti.

CAPITOLO VI

DIVERSITA' FUNZIONALE E GENETICA DELLA MICROFLORA IN SUOLI DI AREE A DIVERSO STADIO SUCCESSIONALE

6.1 PREMESSA

L'ambiente mediterraneo è soggetto, come già detto, a frequenti disturbi antropici, quali l'incendio e il taglio della vegetazione e il pascolo. L'elevata resilienza delle specie vegetali mediterranee fa sì che esse siano in grado di ristabilirsi in tempi brevi dopo il disturbo, dando luogo ad una successione secondaria. Pertanto in questi ambienti spesso coesistono aree a diverso stadio successionale. Ai differenti tipi di copertura vegetale presenti nell'ambiente mediterraneo possono anche corrispondere variazioni nella composizione chimica del suolo, che a loro volta possono influenzare la microflora edafica.

Questa ricerca ha avuto l'obiettivo di stabilire l'effetto, sulla microflora edafica, di differenti tipi di copertura vegetale, che probabilmente sono il risultato di un disturbo antropico (nel caso specifico taglio della vegetazione) che ha agito, nell'area considerata, in modo non omogeneo e/o non simultaneo. A tale scopo in siti che presentavano una diversa copertura vegetale, in relazione del tempo trascorso dopo il taglio della vegetazione, rispettivamente un pratello, una comunità ad arbusti bassi e una comunità di macchia della Riserva Naturale di Castel Volturno (CE), sono stati valutati l'attività, la biomassa e la diversità microbica, quest'ultima valutata sia in termini di diversità funzionale che genetica. Le misure di diversità genetica hanno richiesto la standardizzazione del metodo DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ed il confronto tra due diversi metodi di estrazione di DNA dal suolo e tra tre tecniche di purificazione e quantificazione del DNA.

Questo studio si inserisce nel Progetto di ricerca finanziato nel 2003 dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca dal titolo *“Metabolismo della comunità biotica del suolo in aree a macchia mediterranea in funzione della variabilità della copertura vegetale”* (responsabile scientifico prof. F.A. Rutigliano), parte integrante del Progetto nazionale *“Analisi modellistica dei flussi di C e N in macchia mediterranea: influenza della variabilità spaziale della copertura vegetale”* (coordinatore prof. S. Mazzoleni).

6.2 MATERIALI E METODI

6.2.1 Area di studio

Come per il III caso studio, il suolo (Calcaric Arenosol, FAO, 1998) è stato campionato all'interno della Riserva Naturale di Castel Volturno (paragrafo 5.2.1), in primavera, dopo un lungo periodo piovoso (27/05/2004) e in autunno, al termine della stagione asciutta (11/10/2004). Ad ogni campionamento il suolo è stato prelevato in 3 aree con differente tipo di copertura vegetale (Fig. 6.1):

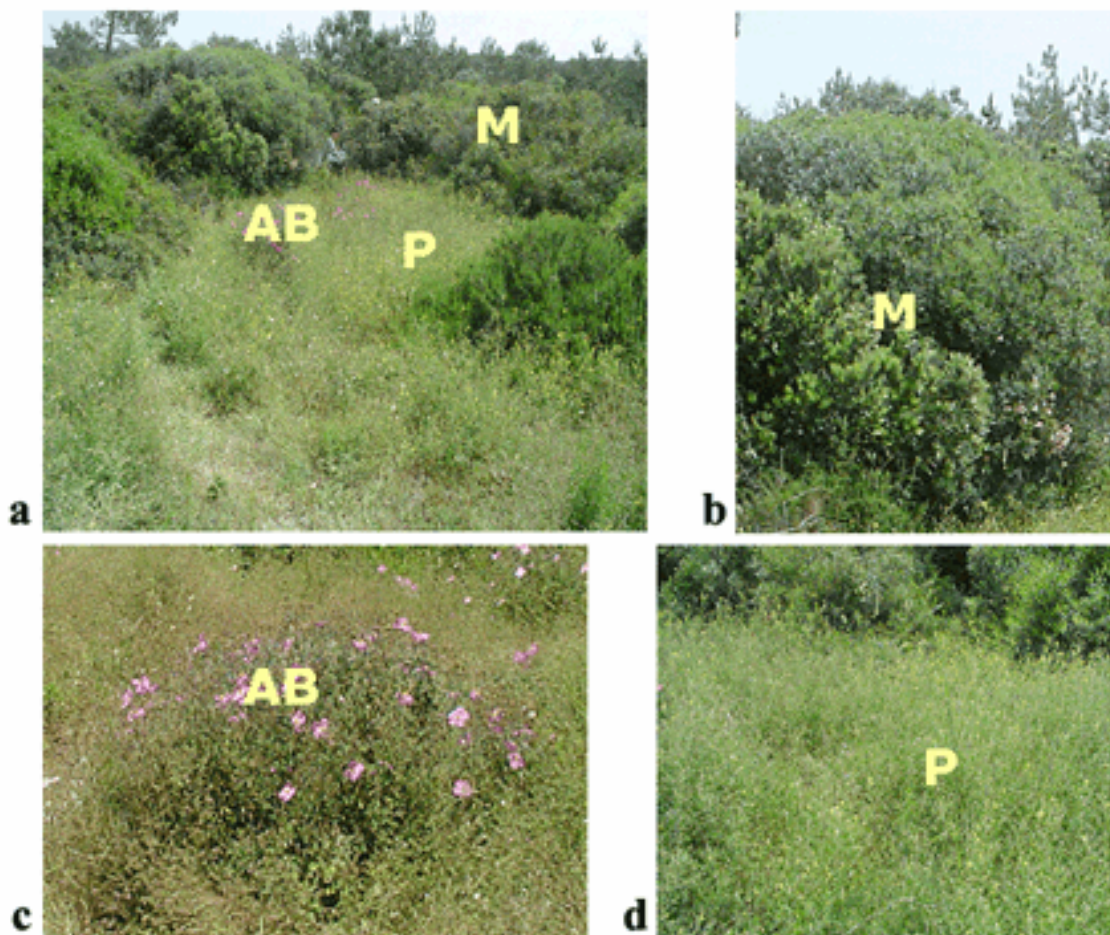


Figura 6.1 - Una delle quattro aree di studio (a) e particolari dei differenti tipi di copertura vegetale: macchia alta (M, foto b), arbusteto basso (AB, foto c), pratello (P, foto d).

- 4 siti di macchia mediterranea alta (M1-M4), caratterizzati da un'altezza massima degli arbusti di 2,5 m. La vegetazione è dominata da leccio (*Quercus ilex*) e fillirea (*Phillyrea angustifolia*), ma sono anche presenti lentisco (*Pistacia lentiscus*) e mirto (*Mirtus communis*). Il prelievo è stato effettuato sempre sotto la chioma di leccio.
- 4 siti di pratelli di macchia (P1-P4) dominati da leguminose, quali *Trifolium scabrum*, *Medicago litoralis* e *Melilotus neapolitana* (ma comprendente anche graminacee, tra cui *Lagurus ovatus*). Il prelievo è stato effettuato sempre sotto leguminose.
- 4 siti di confine tra macchia e pratelli (AB1-AB4) con copertura di arbusti bassi (30-40 cm) di cisto (*Cistus salvifolius*) e rosmarino (*Rosmarinus officinalis*). Il prelievo è stato effettuato sempre sotto cisto.

6.2.2 Analisi del suolo

Sui campioni di suolo, setacciati mediante un setaccio in plastica con maglie di 2 mm, in modo da eliminare lo “scheletro”, sono state effettuate, come descritto nel paragrafo 3.2.2, misure di pH, tenore idrico, contenuto di carbonio organico, biomassa microbica, attività microbica e risposta respiratoria all'aggiunta di substrati semplici. Sono stati inoltre calcolati il quoziente metabolico, il coefficiente di mineralizzazione endogena e la diversità funzionale in termini di indice di omogeneità catabolica (CE). Infine, in questo studio, alla diversità funzionale della comunità microbica del suolo è stata affiancata anche la diversità genetica.

La caratterizzazione molecolare della microflora edafica è stata eseguita tramite il confronto di *fingerprints* generati mediante la tecnica che si basa sull'elettroforesi su gradiente di gel denaturante (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), previa estrazione del DNA dal suolo ed amplificazione tramite PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizzando primer universali per eubatteri (GC968f/1401r). A tale scopo è stato necessario standardizzare il metodo DGGE proposto da Muyzer et al. (1993);

La tecnica di separazione per elettroforesi su gel con gradiente di agente chimico di denaturazione (DGGE) risolve frammenti di DNA della stessa dimensione ma con differente composizione in basi azotate (Muyzer et al., 1993). L'analisi dunque fornisce una serie di profili elettroforetici con una distribuzione caratteristica di bande, ciascuna associabile ad una specie batterica, che nel complesso descrive la struttura molecolare ed il grado di diversità genetica della popolazione microbica del suolo (Muyzer e Smalla, 1998).

Si è scelto di utilizzare sequenze nucleotidiche comprese nel gene 16S rDNA per l'importanza universalmente riconosciuta al gene codificante per la sintesi dell'RNA ribosomiale. Infatti, come attestato da recenti studi di tassonomia molecolare (Olsen e Woese, 1993), all'interno del 16S rDNA si distinguono alcune regioni nucleotidiche fortemente conservate le cui differenze, dovute a variazioni puntiformi nelle basi azotate, aumentano solo con la distanza filogenetica degli individui. Il confronto dei frammenti ottenuti da una miscela di amplificati provenienti da una popolazione complessa fornisce il quadro molecolare dei principali raggruppamenti batterici presenti.

6.2.2.1 Estrazione del DNA totale dal suolo

I protocolli esistenti per l'estrazione del DNA dal suolo si basano su due principali tipi di procedure:

- la lisi indiretta o frazionamento microbico, che prevede un'iniziale separazione delle cellule microbiche dalla matrice suolo mediante centrifugazione e la loro successiva lisi con trattamenti chimici, termici o enzimatici per rilasciare gli acidi nucleici che verranno in seguito sottoposti a procedure di purificazione (Holben et al., 1988; Hopkins et al., 1991; Van Elsas et al., 1997; Duarte et al., 1998; Gabor et al., 2003).
- la lisi diretta, che prevede la lisi delle cellule microbiche direttamente nella matrice suolo con successiva estrazione e purificazione del DNA (Trevors, 1992; Ceccherini et al., 2000). Tale tecnica è meno selettiva della lisi indiretta ma, consentendo l'estrazione del DNA totale dal suolo, permette una stima più rappresentativa delle popolazioni microbiche presenti nel suolo. Questo metodo è inoltre meno laborioso. Per contro presenta difficoltà legate alla natura dei colloidi del suolo, alla presenza di composti polifenolici ed alla resistenza di alcune cellule batteriche e fungine alla lisi (Ceccherini et al., 2000).

L'enorme interesse nell'ottimizzazione dei metodi di estrazione del DNA da campioni ambientali si manifesta in un numero elevato di protocolli. Tanti lavori e diverse *review* hanno discusso le potenzialità ed i limiti dei diversi metodi (Robe et al., 2003) riguardo alla resa (Braid et al., 2003; Nannipieri et al., 2003), alla purezza (Chandler et al., 2000; Oster et al., 2001; Braid et al., 2003) ed integrità della molecola di DNA (Berry et al., 2003). La lisi cellulare può avvenire mediante vari trattamenti meccanici, chimici od

enzimatici (zimolasi, lisozima, proteinasi K e pronasi) capaci di degradare la parete cellulare (Liao et al., 1997; Ceccherini et al., 2003; Tiffany, 2003).

Per individuare la procedura migliore in fatto di rese, ho confrontato due diversi metodi di lisi diretta per l'estrazione del DNA totale dal suolo, il metodo basato sulla lisi meccanica e quello basato sulla lisi enzimatica (*Stool Kit*, Quiagen).

L'estrazione diretta del DNA totale dal suolo, basato sulla lisi meccanica, è stata effettuata mediante *Sistema di Fast Prep*, che prevede un'estrazione rapida di DNA utilizzando solventi organici come il fenolo ed il cloroformio. In particolare il *Sistema di Fast Prep* comprende sia lo strumento *Fast Prep*[®] che il *Fast DNA*[®] *Kit* for SOIL (BIO101 Inc., USA) ed è in grado non solo di lisare le cellule, anche le più resistenti all'azione enzimatica, ma anche di evitare la frammentazione degli acidi nucleici. Lo strumento *Fast Prep*[®] (*FP 120 Fast Prep Cell Disruptor*) consiste in una centrifuga che ha un moto sussultorio ad una velocità molto alta (4.0 – 6.5 metri/secondo). Il *kit* BIO 101 è adatto per l'estrazione di DNA genomico da batteri, funghi, piante ed animali del suolo. La grandezza del DNA ottenuto varia tra 6 e 25 kb. L'estrazione ha una resa di 2-750 µg DNA g⁻¹ suolo, che dipende dalla matrice del suolo e dal numero degli organismi presenti. Le componenti generali del kit sono le seguenti:

Matrice per la lisi: tubi da inserire nel *Fast Prep*[®], che contengono una miscela di sfere di ceramica e di silice di due diverse dimensioni per una lisi efficiente di tutti i microrganismi, compresi quelli difficili, quali le spore degli eubatteri, le endospore, i batteri Gram positivi, i lieviti, le alghe, i nematodi ed i funghi.

Reattivi: includono soluzioni per l'estrazione del DNA e soluzioni per la purificazione del DNA. I primi comprendono l'MT Buffer ed il Sodium Phosphate Buffer, che consentono una completa omogeneizzazione del campione e la solubilizzazione delle proteine. Questi reattivi consentono inoltre di ottenere del DNA genomico quasi privo di RNA. Per la purificazione e l'eluizione del DNA genomico viene utilizzata la procedura *GeneClean*[®], che si basa sull'impiego di una resina di silice ed elimina i contaminanti che inibiscono la Taq Polimerasi.

Il *kit*, oltre ai tubi contenenti la matrice per la lisi e ai reattivi per l'estrazione del DNA e soluzioni per la purificazione del DNA, fornisce anche una soluzione caotropica per stabilizzare il DNA. Si tratta di una miscela di detergenti e sali che svolgono due funzioni: inattivano le nucleasi e favoriscono la separazione del DNA dalla matrice del suolo.

Per ottenere una resa ottimale di estrazione diretta del DNA totale dalla matrice suolo mediante *Sistema Fast Prep*[®] la procedura standard prevede l'utilizzazione di un campione

di suolo di 500 mg, un tempo di disaggregazione di 30 secondi ed una velocità di oscillazione di 5.5 metri/secondo.

Il metodo per l'estrazione diretta del DNA totale dal suolo mediante lisi enzimatica con *Stool Kit* della Quiagen prevede l'utilizzazione di un campione di suolo di 200 mg che viene sottoposto ad una lisi enzimatica in un apposito buffer ed incubazione a 85°C ed eliminazione di inibitori della PCR; il DNA viene poi purificato mediante digestione delle proteine, legame su resina di silice, ed eluizione del DNA puro dalla resina mediante buffer a bassa concentrazione salina.

6.2.2.2 Caratterizzazione qualitativa e quantitativa del DNA estratto

La valutazione della diversità genetica deve essere preceduta dalla misura del contenuto e della purezza del DNA presente nell'estratto di suolo. Tale misura può essere effettuata con una tecnica elettroforetica, spettrofotometrica o fluorimetrica.

6.2.2.2.1 Tecnica elettroforetica – Discussione del metodo e condizioni impiegate

La tecnica della elettroforesi è usata per la separazione di acidi nucleici su gel di agarosio o di acrilamide basandosi sulla migrazione di particelle cariche sotto l'influenza di un campo elettrico. Molecole, come gli aminoacidi, i peptidi, le proteine, i nucleotidi e gli acidi nucleici, possiedono gruppi ionizzabili e quindi sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche. Sotto l'influenza di un campo elettrico, le molecole cariche poste in un gel migrano verso il catodo o l'anodo, a seconda che possiedano una carica positiva o negativa. Gli acidi nucleici, risultando carichi negativamente, per via dei gruppi fosfato, migrano dal polo negativo verso il polo positivo. La velocità della migrazione elettroforetica del DNA/RNA a doppia elica dipende dal peso molecolare dell'acido nucleico, dalla concentrazione d'agarosio (Tab. 6.1), dalla conformazione dell'acido nucleico e dal voltaggio applicato.

In condizioni standard la mobilità elettroforetica delle molecole di DNA è inversamente proporzionale al logaritmo del loro peso molecolare.

% Agarosio	Risoluzione (bp)
0.5	1000-30 000
0.7	800-12000
1.0	500-10000
1.2	400-7000
1.5	200-3000
2.0	50-2000

Tabella 6.1 - Separazione di molecole lineari di DNA a varie concentrazioni d'agarosio.

I gel d'agarosio sono solitamente utilizzati orizzontalmente per via della scarsa consistenza del gel. Il metodo più conveniente per rivelare gli acidi nucleici è quello di visualizzarli nel gel tramite un colorante fluorescente come il bromuro d'etidio (EtBr). Questo composto contiene un gruppo planare che si intercala tra le basi del DNA. L'orientamento e la vicinanza dell'etidio alle basi fa sì che il colorante emetta una fluorescenza maggiore di quella del colorante libero. La radiazione UV a 254 nm è assorbita dal DNA e trasmessa al colorante legato. L'energia viene riemessa a 590 nm nella regione rosso-arancio dello spettro. Il bromuro d'etidio è preparato come soluzione acquosa alla concentrazione di 10 mg/ml, viene usato a concentrazione finale pari a 0.5 µg/ml ed è conservato a 4°C al buio; esso può essere incorporato nel gel e/o nel tampone di corsa, oppure viceversa, il gel può essere colorato dopo la corsa impregnandolo in una soluzione di bromuro d'etidio (0.5 µg/ml per 30 min.)

Il fluorocromo è visualizzato irradiando con raggi UV su un trans-illuminatore e fotografandolo su un film polaroid (b/n).

La sensibilità del rilevamento mediante bromuro d'etidio è intorno a 0.1 µg di DNA. I migliori risultati si ottengono caricando quantità di DNA non superiori a 500 ng/pozzetto e facendo correre il gel con voltaggio di 5 V/cm.

Il DNA totale estratto dal suolo è stato caratterizzato per il peso molecolare, caricando quantità di DNA di 15 µl e 30 µl trattati con blu di bromofenolo 1x, rispettivamente, su gel d'agarosio allo 0.8% in un tampone di corsa 1x (Tris acetato- EDTA, TAE), contenente bromuro di etidio 1x. La corsa elettroforetica è stata di 80 minuti a 100 V. Quindi il gel è stato controllato e fotografato (Polaroid Gel Cam, Elect; Polaroid Type 667 Film ISO 3000) su UV-trans-illuminatore (Genenco).

6.2.2.2.2 Tecnica spettrofotometrica – Discussione del metodo e procedura

Le soluzioni di acidi nucleici purificati, così come quelle di molte altre molecole biologiche, sono incolori, ma possono assorbire nell'ultravioletto; ad esempio il DNA assorbe nell'intorno di 260 nm. Tale assorbimento determina uno "spettro" di assorbimento, che può essere utilizzato per la determinazione della concentrazione del DNA presente nell'estratto. Per una corretta misura quantitativa di oligonucleotidi, più o meno grandi, sarebbe necessario conoscere, per ogni oligonucleotide, il coefficiente di assorbimento, ma per DNA di sequenza e composizione non nota, tale coefficiente non è conosciuto, dato che esso dipende proprio dalla composizione e dalla grandezza del DNA da analizzare.

Una stima abbastanza precisa della concentrazione del DNA presente nella soluzione, può essere ottenuta utilizzando un fattore generale, derivato da una media di valori di coefficienti di assorbimento per vari DNA di varia composizione e dimensione. Ad esempio, per determinare la concentrazione (in $\mu\text{g/ml}$) del DNA a doppia elica (dsDNA) la lettura viene moltiplicata per un fattore 50 e per l'eventuale fattore di diluizione; ciò equivale a dire che una densità ottica (OD_{260}) = 1 corrisponde a 50 $\mu\text{g/ml}$ di dsDNA. Lo stesso fattore però non si applica al DNA a singola elica e all'RNA i cui fattori di moltiplicazione delle letture spettrofotometriche sono rispettivamente 33 e 40. Una caratteristica del DNA analizzato mediante lettura UV è l'*ipocromismo*. Essa consiste nel fatto che l'assorbimento del DNA, o meglio, dell'oligonucleotide, risulta essere più basso dell'assorbimento delle singole basi. L'assorbimento del DNA a doppia elica (dsDNA) è minore rispetto a quello del DNA a singola elica (ssDNA), il quale a sua volta assorbe in misura minore dei singoli nucleotidi liberi.

La tecnica spettrofotometrica può essere utilizzata anche per evidenziare le interferenze dovute a contaminanti. L'estrazione di acidi nucleici dalle cellule è accompagnata dall'estrazione di altre sostanze organiche, come le proteine, che rappresentano le impurezze maggiori. Per una misura qualitativa della purezza del DNA si calcola il rapporto tra l'assorbimento a 260 nm e quello a 280 nm (A_{260}/A_{280}). Il DNA mostra un massimo di assorbanza a 260 nm, mentre le proteine hanno il loro massimo di assorbanza a 280 nm, ragione per cui il controllo della purezza della preparazione viene effettuato calcolando il rapporto tra l'assorbanza alle due lunghezze d'onda (Sambrook et al., 1989). Se il rapporto A_{260}/A_{280} è compreso tra 1,6 e 2,0 la preparazione è da considerarsi pura; un valore minore di 1,6 indica presenza di impurezze residue della preparazione, siano esse

proteine o fenolo, mentre un valore maggiore di 2,0 indica un alto contenuto di RNA (Castro et al., 1995; Tien et al., 1999; Clegg et al., 2000).

L'assorbanza a 230 nm indica una contaminazione del campione dovuta a sostanze come acidi umici (Yeates et al., 1998), polisaccaridi, carboidrati, fenoli, peptidi o composti aromatici. A tale lunghezza d'onda si ha il massimo di assorbimento dei legami peptidici; anche soluzioni tampone come Tris, EDTA ed altri sali di tampone assorbono a questa lunghezza d'onda. Campioni puri dovrebbero avere un rapporto A260/A230 di circa 2.2. Un indice di purezza del DNA fra 1.6 e 1.7 si è rivelato sufficiente per le analisi PCR-DGGE (Kozdrój and Van Elsas, 2000; Agnelli et al., 2004).

La quantificazione del DNA mediante lettura spettrofotometrica (A260) si è rivelata riproducibile per assorbimenti compresi fra 0.1 e 1.0. Valori inferiori a 0.1 e superiori a 1.0 possono essere caratterizzati da deviazioni standard elevate (Qiagen, 2001). Questa tecnica presenta lo svantaggio che si possono avere artefatti a causa di impurezze quali residui cellulari e presenza di minerali argillosi. Il metodo inoltre richiede quantità notevoli di DNA e ciò può essere un fattore limitante.

6.2.2.2.3 Tecnica fluorimetrica

Un'analisi quantitativa del DNA può essere eseguita con il fluorimetro (Hoefer DyNA Quant 200) usando bisbenzimidide - *dye* HOECHST 33258 – un fluorocromo che si lega specificamente al *dsDNA* (*double stranded DNA*) intercalandosi tra le basi A/T. La fluorescenza del bisbenzimidide cambia a seconda che esso sia legato o no al DNA; tali cambiamenti comportano uno *shift* negli spettri di eccitazione ed emissione del fluorescente i quali possono essere rivelati ed utilizzati per calcolare la concentrazione di DNA. Questa tecnica presenta il vantaggio di essere specifica per il DNA a doppia elica, di essere sensibile (il metodo rivela 10 ng DNA/2 ml campione, quantità corrispondente a meno dell'1% di un prodotto di una PCR standard con un volume finale pari a 100 µl), di richiedere un volume piccolo di DNA (2 µl), di non risentire della presenza di sostanze quali proteine, acidi umici, detriti cellulari, minerali argillosi, RNA, *primers*, nucleotidi, che invece interferiscono nella quantificazione spettrofotometrica. Questa tecnica presenta però i seguenti problemi: non fornisce informazioni sul grado di purezza del DNA, richiede la preparazione giornaliera della soluzione colorante e comporta la perdita del campione dopo la prima lettura.

Per la quantificazione del DNA totale estratto da ogni campione di suolo è stata preparata una soluzione (*low range assay solution*) consistente in tampone TNE 10x a pH 7.4 (NaCl 2 M, Tris-Cl 100 mM, EDTA 10 mM, in un volume finale di 1000 ml), sterilizzato in autoclave (1 atm, 121°C per 20 min.) e per filtrazione (0.45 µm), acqua ultra pura (sterilizzata in autoclave e filtrata) ed il fluorocromo Hoechst 33258 (1 mg/ml), in misura rispettivamente di 10 ml, 90 ml e 10 µl. Tale soluzione è idonea a rivelare DNA a concentrazioni comprese fra 10 e 500 ng/ml.

La calibrazione del fluorimetro è stata effettuata con DNA di timo bovino (*Calf thymus*, 100 ng/µl) e le determinazioni sono state eseguite con 2 µl di DNA in 2 ml di *assay solution*.

6.2.2.3 Amplificazione del DNA mediante PCR (polymerase chain reaction)

La tecnica PCR, messa a punto da Mullis nel 1983 (Saiki et al., 1985), premiato col premio Nobel nel 1993, permette una amplificazione molto precisa, la massima resa di prodotto specifico, elevata sensibilità dell'amplificazione di geni non comuni e l'amplificazione di templati lunghi. Questa tecnica è molto utilizzata da laboratori con finalità molto differenti: laboratori di ricerca, diagnostica, analisi agro-alimentari ed ambientali. Per la sua estrema sensibilità e specificità, la PCR ha un numero incredibile di applicazioni tra cui, il clonaggio di sequenze genomiche e di trascritti, il sequenziamento diretto di frammenti di DNA, la mutagenesi in vitro e l'analisi della variabilità di sequenze nucleotidiche (Head et al., 1998; De Oliveira et al., 1999; O'Donnel and Görres, 1999; White et al., 1990). La prima DNA polimerasi termostabile ad essere introdotta sul mercato è stata la Taq DNA polimerasi (estratta dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*), che essendo stabile ed attiva ad alte temperature ha permesso di eseguire le tre fasi termiche della PCR quali la denaturazione del DNA, l'ibridazione (annealing) e l'estensione, con un'unica aggiunta iniziale di enzima (Van Elsas e Wolters, 1995). La Taq DNA polimerasi mantiene l'attività catalitica anche dopo parecchi cicli di denaturazione a 95 °C ed inoltre la sua attività ottimale si esplica nello stesso intervallo di temperatura in cui avviene l'ibridazione ad elevata stringenza dei primers (50-75°C). L'enzima ha una blanda attività 5'-3' esonucleasica ed è priva di attività 3'-5' esonucleasica (la cosiddetta attività di proof reading o di correzione di bozze). Il tasso di errore è 2.2×10^{-5} errori per nucleotide per

ciclo, mentre l'accuratezza, l'inverso del tasso di errore, ossia una media del numero di nucleotidi che la polimerasi incorpora prima di fare un errore, è 4.5×10^4 .

La reazione a catena della polimerasi permette di superare il problema dell'eventuale scarsa presenza delle sequenze nucleotidiche di interesse. L'amplificazione mediante PCR del DNA in oggetto, con l'utilizzo di oligonucleotidi aspecifici o specifici per una determinata sequenza genica (primers), permette di moltiplicarne la presenza di un fattore dell'ordine di 10^6 ; in tal modo si rende possibile anche lo studio di geni scarsamente rappresentati nei campioni presi in esame (Tsai and Olson, 1992). La PCR proveniente dal campo medico è stata recentemente adattata all'analisi del DNA estratto dal suolo (Van Elsas e Wolters, 1995) rappresentando una svolta decisiva nell'ecologia molecolare.

Per effettuare la DGGE eubatterica si utilizzano frequentemente, nella fase di amplificazione, primers che amplificano il frammento 968-1401 del 16S rRNA gene, che si colloca nelle regioni variabili V6 e V8 (Smalla et al., 1998). I numeri con i quali si indicano i primers indicano la posizione del 5' nucleotide nel 16S rDNA di E.coli (Brosius et al., 1978 and 1981). Tali primers sono specifici per le regioni 16S altamente conservate negli eubatteri e sono detti universali, cioè idonei al monitoraggio di tutti gli eubatteri (Nübel et al., 1996; Felske et al., 1997 and 1999; Heuer et al., 1997; Brim et al., 1999; Lottmann et al., 2000; Nakatsu et al., 2000; Brümmer et al., 2003).

I primers universali per gli eubatteri, utilizzati nella mia tesi, sono GC968f/1401r che originano un amplicone da 473 bp contenente una sequenza di coda GC (40mer) per la DGGE. La sequenza della coda di GC, aggiunta al 5' termine del PCR-amplicone, garantisce una separazione accurata dei prodotti di PCR nell'elettroforesi a gradiente denaturante (Muyzer et al., 1993; Felske et al., 1997). La miscela di reazione per la PCR conteneva 1.25 µl dei primers forward (GC968f, 5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TA-3') e reverse (1401r, 5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3') (10 µM; Microsynth), 5 µl di tampone di reazione (10x, privo di $MgCl_2$; Polymed), 7.5 µl $MgCl_2$ (10 mM; Polymed), 10 µl BSA (500 µg ml⁻¹; Roche), 1.25 µl dNTP-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1:1:1:1, 10mM ciascuno; Roche), 0.5 µl PolyTaq - polimerasi (5 U µl⁻¹; Polymed), 15.25 µl H₂O ultrapura (sterilizzata e filtrata) e 8 µl di DNA stampo (10 ng µl⁻¹). Il volume finale della miscela di reazione per la PCR era di 50 µl per ogni campione di DNA da amplificare.

La 16S rDNA-PCR è stata effettuata con il termociclatore Perkin-Elmer 2400 thermocycler con una denaturazione iniziale a 94°C per 90 secondi, seguita da 33 cicli a 95°C per 20

secondi, 30 secondi a 56°C, 45 secondi a 72°C, ed un'estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Al termine della PCR, aliquote di ampliconi (5 µl) sono state controllate mediante elettroforesi su gel di agarosio (1x TAE, 0,8% w/v), paragonando le bande degli ampliconi con quelle a peso molecolare noto di un DNA- Marker (Mass Ruler, DNA Ladder Mix, Fermentas).

6.2.2.4 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

La DGGE è stata introdotta recentemente negli studi di ecologia microbica del suolo da Muyzer et al. (1993). Tale tecnica, basata sul fingerprinting di geni del 16S rDNA, è risultata idonea per lo screening di comunità microbiche complesse (Muyzer et al., 1993; Heuer et al., 1997; Nakatsu et al., 2000), per risalire ai rapporti filogenetici fra i membri delle comunità microbiche (Muyzer et al., 1995), per determinare la purezza di ceppi batterici isolati da vari ambienti (Brinkhoff and Muyzer, 1997), per studiare le dinamiche di popolazioni specifiche in relazione a variazioni ambientali (Ferris et al., 1996; Teske et al., 1996; Renella et al., 2003, b) e per studiare la distribuzione spaziale delle comunità microbiche (Agnelli et al., 2004).

La denaturazione del DNA viene facilitata dalla presenza di ammidi a basso peso molecolare come formammide (fino al 50%) ed urea (fino ad 8 M) (Boncinelli e Simeone, 1991). Il concetto su cui si basa la DGGE è che il DNA a doppia elica ossia i due filamenti complementari del DNA si separano in presenza di alta temperatura o di un denaturante chimico. La temperatura che causa la denaturazione del DNA (melting temperature, T_m) dipende:

1. dai legami d'idrogeno che legano le paia di basi complementari fra di loro; sequenze con regioni ricche in GC (Guanina-Citosina) si denaturano a temperatura superiore rispetto alle sequenze ricche in AT (Adenina-Timina);
2. dall'attrazione fra le basi vicine le une alle altre sullo stesso filamento di DNA (strand).

Di conseguenza, una molecola di DNA può essere caratterizzata da diversi domini di fusione (melting domains) con proprietà di denaturazione (T_m) diverse, in base alle sue sequenze nucleotidiche.

Molecole di DNA che differiscono per un solo nucleotide (low melting domain) sono caratterizzate da temperature di denaturazione diverse. La separazione del DNA avviene mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide contenente un crescente gradiente denaturante (formammide ed urea), che causa la dissociazione delle low melting domains, riducendo la mobilità elettroforetica della molecola di DNA. Infine la struttura ramificata delle due catene dissociate risulta “intrappolata” nella matrice e di conseguenza non si ha mobilità. La completa separazione delle due eliche viene inibita dalla presenza di una high melting domain, il cosiddetto GC-clamp (sequenza di 40 GC), artificialmente aggiunta al terminale 5’ di uno dei primer (primer forward o primer reverse). E’ necessario impedire la completa dissociazione delle due eliche al fine di ottenere una buona risoluzione delle bande. Per la determinazione della diversità genetica, mediante DGGE, gli amplificati ottenuti dalla PCR relativi ai campioni di suolo prelevati sotto la stessa copertura vegetale, in ciascuna stagione, sono stati omogenizzati e dal pool di DNA ottenuto sono stati ricavati due subcampioni. La 16S rDNA-DGGE è stata eseguita su 300 ng DNA mediante DCode System (Universal Mutation Detection System, Biorad). Sono quindi state effettuate eventuali diluizioni degli amplificati per ottenere circa 300 ng di DNA per tutti i campioni. I campioni di DNA sono stati trattati con un colorante (loading dye, 2x; Biorad), costituito da blu di bromofenolo (BBF) e xilene cianolo (Tab. 6.2) e caricati su gel di poliacrilammide al 6% (Acrylamide/Bisacrylamide, 40%, 37.5:1, Biorad) con un gradiente denaturante di 46-56% parallelo alla direzione dell’elettroforesi formato da urea e formamide; un denaturante al 100 % contiene urea 7 M e formamide al 40%.

% Acrilammide non denaturante	Blu di bromofenolo dsDNA (bp)	Xilene cianolo dsDNA (bp)
3.5	100	460
5	65	260
8	45	160
12	20	70
15	15	60
20	12	45

% Acrilammide denaturante	Blu di bromofenolo ssDNA (nucleotidi)	Xilene cianolo ssDNA (nucleotidi)
5	35	140
6	26	106
8	19	75
10	12	55
20	8	28

Tabella 6.2 - Separazione di DNA a doppio filamento, dsDNA (in alto) e di DNA a singolo filamento, ssDNA (in basso), a varie concentrazioni di acrilammide non denaturante e denaturante, rispettivamente, mediante DGGE; (bp, paio di basi).

La DGGE è stata replicata due volte per ciascun campione. La durata della corsa elettroforetica è stata di 16 ore ad un voltaggio costante di 70 V ed una temperatura costante di 60°C in tampone TAE 1x. Al termine della corsa, il gel è stato colorato per 2 ore al buio con SybrGreen I (Nucleic acid gel stain; FMC Bio Products, Rockland, ME USA) diluito 1:10000 con TAE 1x. Quindi le bande sono state rivelate e fotografate (Polaroid Gel Cam, Elect; Polaroid Type 667 Film ISO 3000) su UV – trans-illuminatore. Nel primo e nell’ultimo pozzetto dei gel è stato caricato DNA di *B. subtilis*, poiché tale DNA, generando profili di DGGE caratteristici, rende più accurate le interpretazioni del gel; infatti, nel caso in cui si verificassero fenomeni di cosiddetto gel smiling, ossia la distorsione del gel di poliacrilamide, le bande del marker (*B. subtilis*) potrebbero servire come bande di riferimento per effettuare un allineamento delle altre bande che hanno migrato nello stesso modo.

6.3 ELABORAZIONE DEI DATI

6.3.1 Parametri chimici e biologici

I dati riportati nei grafici e nelle tabelle rappresentano la media (\pm deviazione standard) delle 4 repliche di campo per ciascun tipo di copertura vegetale e per ciascuna stagione di campionamento.

Per valutare la significatività delle differenze, per ciascun parametro considerato, tra i suoli prelevati in differenti tipi di copertura vegetale, nell'ambito di ciascuna stagione di campionamento, è stata eseguita un'analisi della varianza (ANOVA) ad una via, seguita dallo Student-Newman-Keuls test ($P < 0.05$), mediante il software Sigma Stat 1.0. La significatività delle differenze, per ogni parametro, tra suoli prelevati in differenti stagioni nello stesso tipo di copertura vegetale è stata valutata mediante t-test (Sigma Stat 1.0).

La correlazione lineare tra i diversi parametri è stata testata tramite coefficiente di Pearson (Sigma Stat 1.0).

6.3.2 Analisi dei DGGE – *fingerprints*

La similarità delle comunità batteriche di campioni diversi possono essere determinate calcolando i coefficienti di similarità (Sørensen, 1948; Nakatsu et al., 2000) che si basano sul numero di bande in comune di due campioni. Due bande sono considerate uguali quando mostrano le stesse caratteristiche elettroforetiche nel gel di poliacrilamide (Nakatsu et al., 2000). La prima fase dell'analisi si basa sulla caratterizzazione dei diversi profili di DGGE, uno per uno, con conta delle bande. In seguito, due profili vengono confrontati ed analizzati per la presenza oppure assenza di singole bande. Il lavoro termina quando tutti i profili sono confrontati fra loro. Come indice di similarità è stato scelto quello proposto da Sørensen (1948) il quale consente la determinazione della similarità fra due comunità microbiche in base al numero delle popolazioni in comune.

L'indice di Sørensen è definito come $IS_{1,2} = 2c/(a+b)$, dove a e b sono il numero di bande in ciascuno dei due campioni in esame; c è il numero di bande in comune fra gli stessi due campioni. Quando il valore di IS è 0 si ha la completa diversità dei profili, ossia nessuna banda è in comune ai due campioni confrontati, mentre per un valore di 1 si ha la completa

identità, il che significa che tutte le bande sono presenti nei due profili (Turpeinen *et al.*, 2003). Maggiore è la diversità dei due profili e minore è la somiglianza degli stessi.

L'indice di Sørensen (1948), pur essendo un indice di similarità semplice, si è affermato come uno strumento valido per descrivere la similarità fra le popolazioni di due campioni (Wetton *et al.*, 1987; Bruford *et al.*, 1992; Nakatsu *et al.*, 2000; Caparroz *et al.*, 2001; Renella *et al.*, 2003, a; Abbate *et al.*, 2003). Le immagini digitali dei DGGE -profili (Polaroid Gel Cam, Elect; Polaroid Type 667 Film ISO 3000) sono state analizzate e le impronte digitali dei vari campioni sono state confrontate fra di loro, in modo da ottenere una caratterizzazione della microflora del suolo a livello di comunità microbiche.

6.4 RISULTATI

6.4.1 Aspetti metodologici relativi alla determinazione della diversità genetica della microflora edafica

L'efficienza estrattiva dei due metodi ottimizzati in questa tesi è stata confrontata su ciascun campione di suolo analizzato (Fig. 6.2). Entrambi i metodi hanno fornito rese molto basse rispetto a quelle previste dal protocollo ($75\text{-}300\text{ }\mu\text{g DNA g}^{-1}\text{ suolo}$ per il metodo di lisi enzimatica, $1\text{-}150\text{ }\mu\text{g DNA g}^{-1}\text{ suolo}$ per il metodo di lisi meccanica), comprese tra $0\text{ e }1\text{ }\mu\text{g DNA g}^{-1}\text{ suolo}$, per il metodo enzimatico, e tra $0,13\text{ e }2,52\text{ }\mu\text{g DNA g}^{-1}\text{ suolo}$, per il metodo di lisi meccanica, con maggiori efficienze ottenute con il metodo di lisi meccanica (Fig. 6.3). Pertanto in base ai risultati ottenuti dalla valutazione dei metodi per l'estrazione diretta del DNA dalla matrice suolo, è stato adottato il metodo della lisi meccanica (Fast DNA Kit for soil BIO101) come metodo standard in questo caso studio.

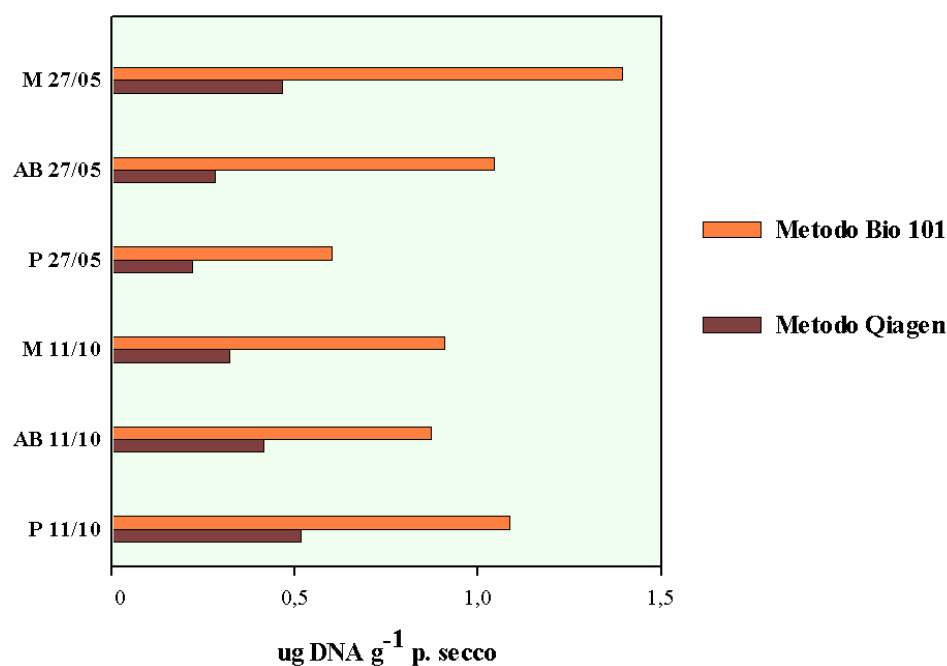


Figura 6.2 - Confronto tra le efficienze estrattive dei due metodi sperimentati (metodo Qiagen, basato sulla lisi enzimatica e metodo Bio 101, basato sulla lisi meccanica).

La quantificazione del DNA è stata effettuata tramite tecnica fluorimetrica, in quanto entrambi i metodi di estrazione non hanno generato quantità di DNA sufficienti da essere rivelate su gel di agarosio né da consentire di effettuare misure allo spettrofotometro.

Avendo ottenuto dall'estrazione una resa molto bassa in DNA, la 16SrDNA-PCR è stata effettuata con primer universali per eubatteri sul DNA totale tal quale (non diluito) estratto da ciascun campione di suolo. La PCR non ha generato quantità sufficienti di ampliconi da essere rivelati su gel d'agarosio, tranne che per i suoli dei siti M3 ed M4 prelevati ad ottobre (Fig. 6.3a); probabilmente le complicazioni riscontrate durante questa fase di amplificazione del DNA sono state causate, oltre che dallo scarso contenuto in DNA dei suoli, anche dalla presenza negli estratti di sostanze che esercitano un'azione fortemente inibente sulla *Taq Polimerasi*. A giudicare anche dal colore scuro degli estratti che permane anche dopo la purificazione, tali sostanze non vengono eliminate completamente dai reagenti per la purificazione del DNA contenuti nei kit di estrazione utilizzati in questo lavoro.

Per ottenere un'amplificazione su tutti i campioni, è stata effettuata quindi una *double PCR* (Fig. 6.3b) sui prodotti della prima PCR, con gli stessi primer universali per eubatteri. La double PCR ha consentito di effettuare una diluizione dei contaminanti che inibiscono la *Taq polimerasi* e contemporaneamente ha evidenziato anche le scarse quantità di DNA ottenute dalla prima PCR. La double PCR ha generato ampliconi di grandezza pari a 473 paia di basi (bp). Nella foto in Fig. 6.3b si può osservare che le bande dei campioni prelevati a maggio (le 12 bande in alto) sono molto più deboli delle bande dei campioni prelevati ad ottobre (le 12 bande in basso), rivelando pertanto una maggiore, seppur piccola in assoluto, quantità di DNA nei suoli prelevati ad ottobre. Tale ipotesi è confermata dal fatto che le bande dei primer dei campioni di maggio sono più intense di quelle dei campioni di ottobre (Fig. 6.3b), il che indica che probabilmente negli amplificati dei primi è rimasta una maggiore quantità di primer liberi, poiché nella miscela di reazione per l'amplificazione era presente una minore quantità di DNA da legare.

Le immagini digitalizzate dei gel della rDNA PCR-DGGE con *primer* universali per gli eubatteri sono state analizzate sia per il numero di bande, sia per l'Indice di Similarità (IS). Quest'ultimo è stato applicato soltanto per comparare diversi trattamenti, e non come una misura di diversità assoluta. Come si può osservare dalla figura 6.7, le due repliche ottenute dal pool di DNA relativo al campione di suolo prelevato, in ciascuna stagione, sotto la stessa copertura vegetale, sono risultate identiche fra di loro, come confermato

dagli indici di similarità pari a 1, indicando un'alta riproducibilità delle analisi condotte con *primer* eubatterici.

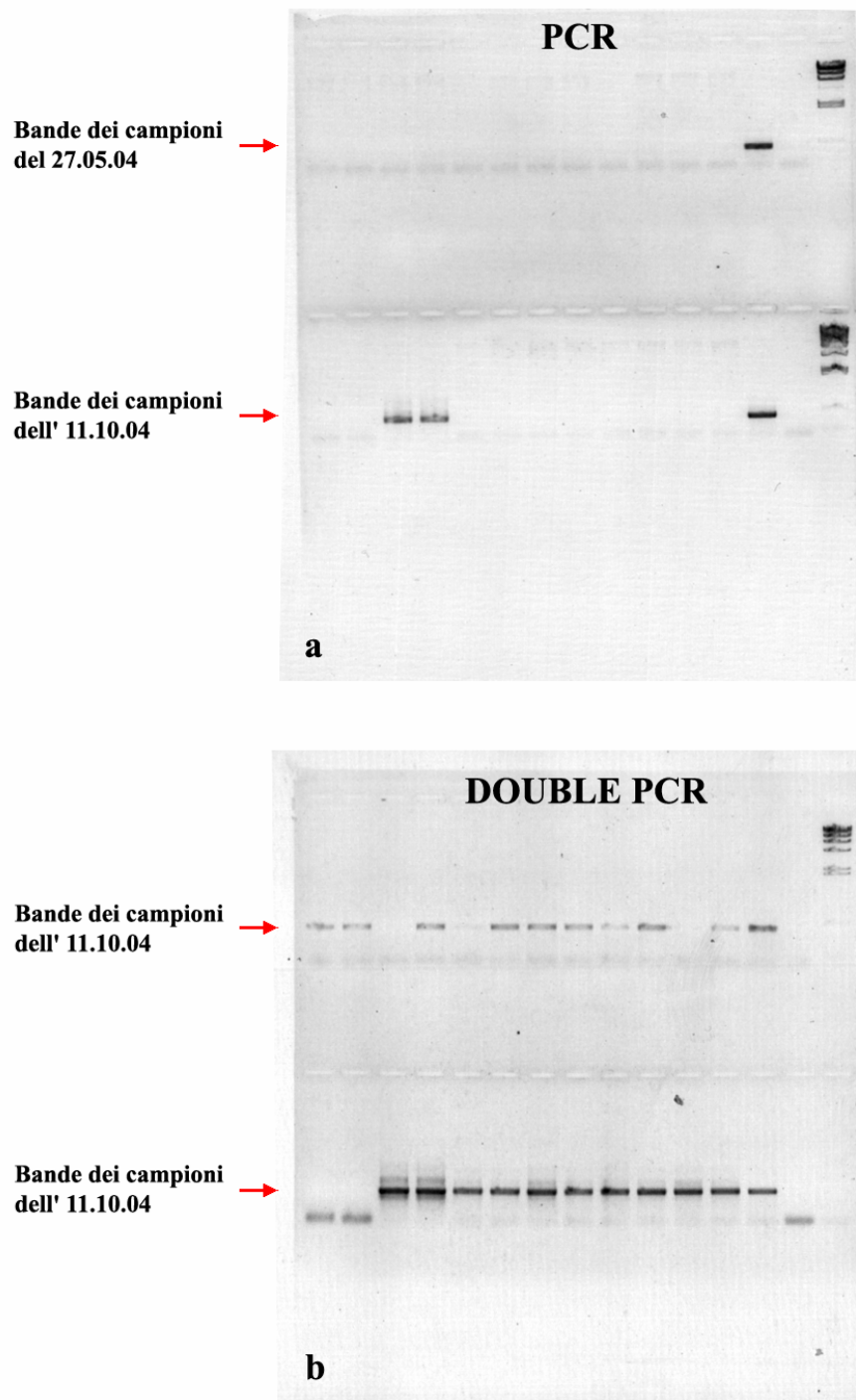


Figura 6.3 - Gel elettroforesi del DNA totale estratto ed amplificato mediante 16 S rDNA - PCR (a) e double PCR (b). Sequenza dei campioni sul gel: (da sinistra) M1, M2, M3, M4 , AB1, AB2, AB3, AB4, P1, P2, P3, P4 ; C+ (controllo positivo, DNA amplificato di *Bacillus subtilis*) C- (controllo negativo, senza DNA), M (High Mass DNA ladder, 10 kb - 80 bp, Fermentas). Il volume di DNA caricato su gel all'1% era di 5 µl con 1 µl di BBF (6x). L'elettroforesi è stata effettuata a 100 V per 60 minuti.

6.4.2 Effetto della copertura vegetale e della stagione di campionamento sulla microflora edafica

Il pH del suolo ha presentato valori compresi tra 7,4 e 7,6 (Tab. 6.3), pertanto il suolo è sub-alcalino, secondo la classificazione di Sequi (1989).

Campione	pH	Tenore idrico %	Carbonio Organico (g kg ⁻¹)
<u>27/05/2004</u>			
macchia	7,5 (±0,1)	16,65 (±2,34)a	42,68 (±2,96)
arbusteto basso	7,4 (±0,1)	13,12 (±2,17)ab	37,72 (±1,90)
pratello	7,5 (±0,1)	10,07 (±3,17)b	41,09 (±3,68)
<u>11/10/2004</u>			
macchia	7,5 (±0,2)	6,90 (±3,19)*	50,04 (±8,15)
arbusteto basso	7,6 (±0,1)*	3,90 (±1,16)*	38,56 (±2,34)
pratello	7,59 (±0,10)	3,43 (±0,97)*	38,02 (±5,05)

Tabella 6.3 – Valori medi (± errore standard) di pH, tenore idrico, carbonio organico nei suoli campionati in primavera (27/05/04) e in autunno (11/10/04) sotto i differenti tipi di copertura vegetale (macchia, arbusteto basso, pratello). Lettere diverse in apice ai valori medi indicano differenze significative tra i suoli sotto differente copertura arborea nel primo campionamento (lettere minuscole), tra i suoli sotto differente copertura arborea nel secondo campionamento (lettere maiuscole), tra i due campionamenti per i suoli sotto la stessa copertura vegetale (asterischi).

I risultati ottenuti hanno mostrato che il tipo di copertura vegetale e la stagione di campionamento non hanno influenzato il pH né il contenuto di carbonio organico dei suoli analizzati (Tab. 6.3), anche se il contenuto di carbonio ha mostrato valori lievemente più elevati nel suolo della macchia che in quelli degli altri tipi di copertura vegetale nel campionamento autunnale.

Il tenore idrico ha subito invece notevoli variazioni in relazione sia alla copertura vegetale che alla stagione di campionamento (Tab. 6.3). Esso è risultato più elevato nei suoli di macchia che in quelli dell'arbusteto basso e del pratello, con differenze significative solo per il prelievo primaverile, e, nei suoli di tutte e tre le coperture vegetali, è risultato significativamente ridotto nella stagione autunnale rispetto alla stagione primaverile.

Il carbonio microbico è risultato più sensibile ai cambiamenti stagionali dei fattori ecologici che al tipo di copertura vegetale, mostrando infatti una riduzione in autunno (Fig. 6.4). Il contenuto di carbonio microbico è risultato positivamente correlato al tenore idrico e negativamente correlato al pH (Tab. 6.4).

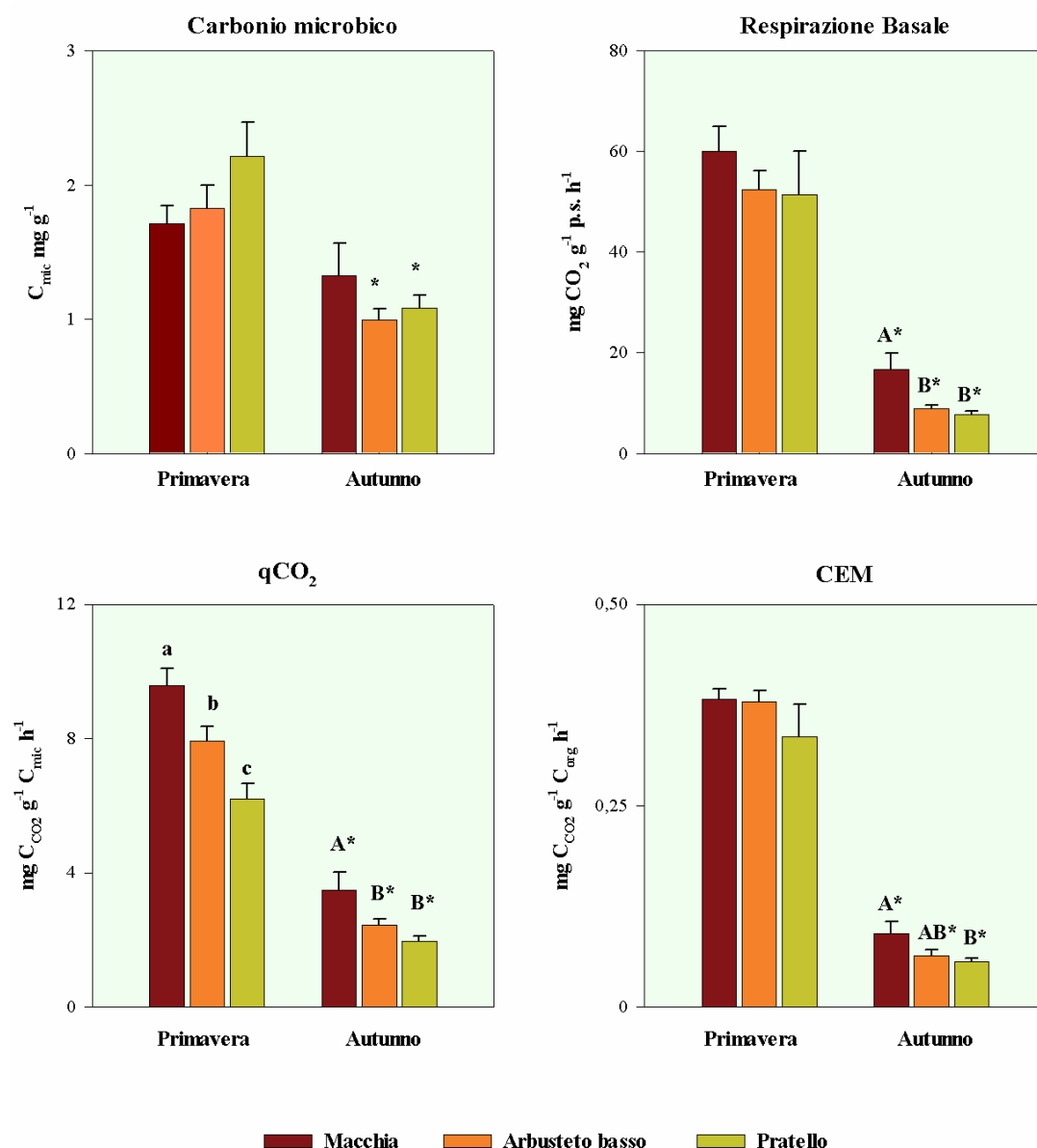


Fig. 6.4. Valori medi (+ errore standard) di carbonio microbico, respirazione basale, quoziente metabolico (qCO_2) e coefficiente di mineralizzazione endogena (CEM) nei suoli campionati in primavera (27/05/04) e in autunno (11/10/04) sotto i differenti tipi di copertura vegetale (macchia, arbusteto basso, pratello). Lettere diverse sulle barre indicano differenze significative tra i suoli sotto differente copertura arborea nel primo campionamento (lettere minuscole), tra i suoli sotto differente copertura arborea nel secondo campionamento (lettere maiuscole), tra i due campionamenti per i suoli sotto la stessa copertura vegetale (asterischi).

La respirazione potenziale è risultata più alta nel suolo della macchia rispetto ai suoli degli altri tipi di copertura vegetale soltanto nel campionamento autunnale (Fig. 6.4). Essa è risultata significativamente ridotta in autunno rispetto alla primavera. La respirazione è risultata positivamente correlata al tenore idrico del suolo e al contenuto di carbonio microbico e negativamente correlata al pH (Tab. 6.4).

Il quoziente metabolico dei suoli ha mostrato una progressiva e significativa riduzione passando dal suolo prelevato in macchia a quello prelevato sotto l'arbusteto basso e da quest'ultimo al suolo sotto pratello, per quanto riguarda il campionamento primaverile (Fig. 6.4). In autunno differenze significative sono state osservate tra macchia e gli altri due tipi di copertura vegetale. Il quoziente metabolico è risultato influenzato, oltre che dal tipo di copertura vegetale anche dalla stagione, presentando una riduzione significativa nei suoli campionati in autunno rispetto a quelli campionati in primavera, per ciascun tipo di copertura vegetale. Il quoziente metabolico è risultato positivamente correlato al tenore idrico del suolo (Tab. 6.4).

Il coefficiente di mineralizzazione endogena è risultato più alto nel suolo della macchia che nel suolo del pratello solo nel campionamento autunnale. Esso è invece risultato influenzato in modo più marcato dalla stagione di campionamento, mostrando una marcata e significativa riduzione in autunno (Fig. 6.4). Il coefficiente di mineralizzazione endogena è risultato negativamente correlato al pH e positivamente correlato al contenuto di C microbico e al tenore idrico del suolo (Tab. 6.4).

pH									
T.idrico %	-0,518**								
C_{org}	-0,484*	0,283							
C_{mic}	-0,572**	0,723***	0,384						
RB	-0,460*	0,932***	0,138	0,837***					
qCO₂	-0,387	0,923***	0,017	0,603**	0,930***				
CEM	-0,439*	0,886***	-0,039	0,766***	0,973***	0,944***			
CE	-0,461*	0,194	0,838***	0,390	0,087	-0,076	-0,050		
IMR	-0,105	0,274	-0,384	0,206	0,348	0,418*	0,471*	-0,480*	
N. bande	0,257	0,044	0,193	-0,297	-0,099	0,038	-0,141	-0,248	-0,230
	pH	Tenore idrico %	C_{org}	C_{mic}	RB	qCO₂	CEM	CE	IMR

Tabella 6.4 - Coefficienti di correlazione lineare di Pearson tra i parametri considerati.
(* = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001; 12<N<24)

L'indice di diversità funzionale non ha messo in evidenza valori significativamente differenti tra suoli prelevati sotto differenti tipi di copertura vegetale, in nessun campionamento, né tra suoli prelevati sotto la stessa copertura vegetale in differenti periodi di campionamento (Fig. 6.5). Esso è risultato positivamente correlato al contenuto di C organico e negativamente correlato al pH (Tab. 6.4).

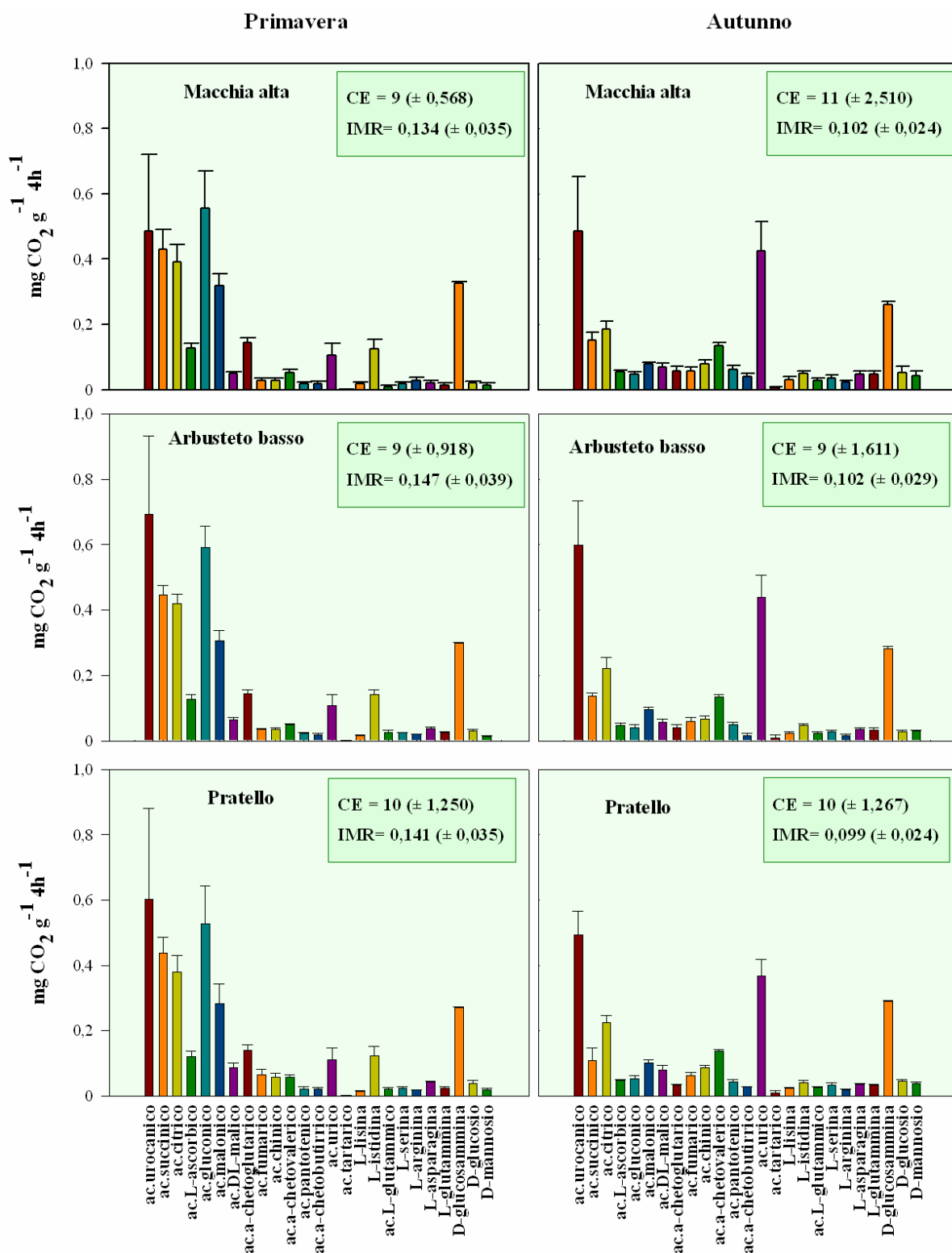


Fig.6.5 - Profili di risposta catabolica, misurati come incremento dell'evoluzione di CO_2 ($mg\ CO_2\ g^{-1}\ suolo\ 4h^{-1}$), nei suoli campionati in primavera (27/05/04) e in autunno (11/10/04) sotto i differenti tipi di copertura vegetale (macchia, arbusteto basso, pratello). In alto a destra sono riportati i valori degli indici di omogeneità catabolica ($CE \pm$ errore standard) e degli incrementi medi di respirazione ($IMR \pm$ errore standard) dovuti all'aggiunta dei 25 substrati. Non sono state rilevate differenze significative per i valori di CE ed IMR tra i suoli prelevati sotto differente copertura vegetale nella stessa stagione, nè tra i due campionamenti per i suoli sotto la stessa copertura vegetale.

Al contrario, l'impronta catabolica, cioè la rappresentazione della risposta dei suoli all'aggiunta di ogni substrato, è risultata simile, ad ogni campionamento, tra differenti tipi di copertura vegetale, mentre è risultata molto diversa tra le differenti stagioni, per ciascun tipo di copertura vegetale (Fig. 6.5). L'incremento respiratorio medio è risultato significativamente maggiore in primavera che in autunno (Fig. 6.5).

I profili di DGGE di tutti i suoli analizzati sono risultati molto simili relativamente al numero di bande, compreso in generale tra 14 e 16 (Fig. 6.6). I suoli M e AB sono caratterizzati da un numero di bande lievemente superiore rispetto al suolo P, sia nel prelievo primaverile che nel prelievo autunnale.

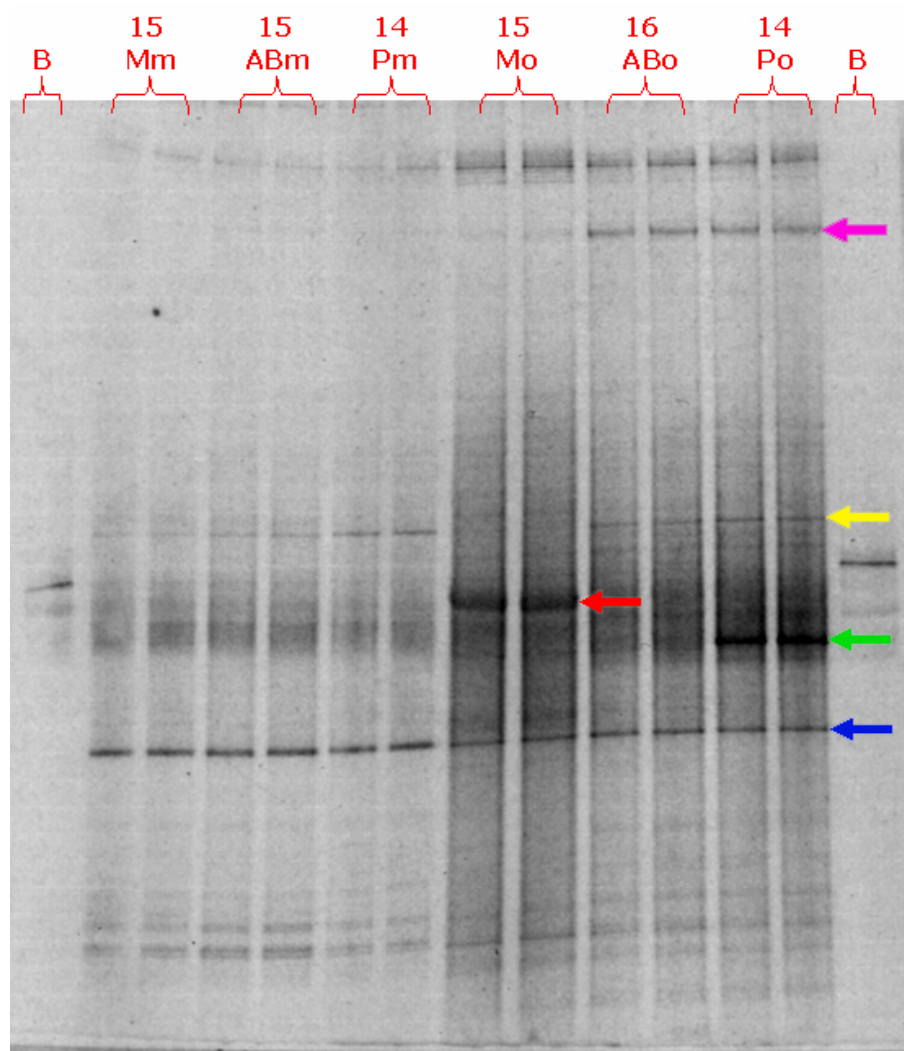


Fig. 6.6 - Struttura molecolare delle comunità batteriche dei suoli prelevati sotto diversa copertura vegetale (macchia, arbusteto basso, pratello), in primavera (Mm, ABm, Pm) ed in autunno (Mo, ABo, Po), rivelata mediante 16S rDNA - PCR - DGGE. I numeri indicano le bande relative a specie batteriche dominanti. Le frecce di diverso colore indicano le bande marcate e caratteristiche osservate per i suoli prelevati in autunno.

Il confronto tra i *fingerprints* del DNA dei suoli prelevati ad ottobre con quelli del DNA dei suoli prelevati a maggio ha messo in evidenza una maggiore intensità delle bande nei primi. Nel prelievo autunnale è stata anche riscontrata una maggiore quantità di DNA che nel prelievo primaverile, nel suolo del pratello, mentre nei suoli della macchia e dell'arbusteto basso la maggiore quantità di DNA è stata osservata nel prelievo primaverile (Fig. 6.6).

I suoli prelevati in primavera sotto diversi tipi di copertura vegetale hanno mostrato profili di DGGE molto simili tra loro; ciò denota una somiglianza nel numero di popolazioni batteriche dominanti, a differenza dei suoli prelevati in autunno. Infatti questi ultimi, pur presentando profili di DGGE simili per numero di bande (15, 16 e 14, rispettivamente in M, AB e P), hanno mostrato profili notevolmente diversi per la composizione delle bande, sia tra di loro che rispetto ai suoli prelevati in primavera, e quindi una notevole diversità nella composizione delle comunità batteriche. I *fingerprints* del DNA dei suoli prelevati ad ottobre sono infatti caratterizzati da diverse bande non presenti nel DNA dei suoli prelevati a maggio sotto la stessa copertura vegetale (Fig. 6.6). In particolare bande marcate e caratteristiche sono risultate evidenti nel profilo di DGGE del suolo prelevato ad ottobre nella macchia (Mo, freccia rossa), nel pratello (Po, frecce verde e viola) e nell'arbusteto basso (ABo, freccia viola).

Quattro bande, ossia quattro popolazioni batteriche, sono in comune a tutti i suoli (Fig. 6.6 freccia blu). Le bande indicate dalla freccia gialla invece (Fig 6.6) sono presenti in tutti i suoli tranne che nel suolo della macchia campionato in ottobre.

Gli indici di similarità di Sørensen hanno confermato la presunta variabilità nella composizione delle comunità batteriche dei suoli prelevati in autunno. Infatti le comunità batteriche dei suoli prelevati in ottobre nella macchia (Mo), nell'arbusteto basso (ABo) e nel pratello (Po) hanno mostrato indici di similarità relativamente bassi, pari a 0.52 (Mo/ABo), 0.48 (Mo/Po) e 0.8 (Po/ABo), rispetto ai suoli prelevati in primavera, caratterizzati da indici di similarità compresi tra 0.96 e 1. In generale, gli indici di similarità hanno messo in evidenza che il più basso grado di similarità fra le comunità batteriche si ottiene confrontando suoli di macchia con suoli di pratelli.

Non è stata rilevata correlazione tra numero di bande ed indice di omogeneità catabolica (Tab. 6.4).

6.5 DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno fornito utili informazioni inerenti gli aspetti metodologici nella determinazione della diversità genetica della microflora edafica. In particolare, dal confronto tra le efficienze estrattive ottenute con i metodi di lisi meccanica e di lisi enzimatica è emerso che il metodo basato sulla lisi meccanica ha una maggiore efficienza rispetto a quello basato sulla lisi enzimatica, almeno in suoli poveri di DNA, come quelli utilizzati in questo studio. Questo risultato è in accordo con quanto osservato da Ascher et al. (dati non pubblicati) che, in uno studio finalizzato alla caratterizzazione molecolare di un intero profilo di suolo, ha riscontrato una maggiore efficienza del metodo di lisi meccanica, soprattutto nei suoli con scarso contenuto in DNA. Pertanto il metodo basato sulla lisi enzimatica, pur essendo meno laborioso e più veloce, si è dimostrato inadatto a suoli con uno scarso contenuto in DNA, fornendo rese che, per quasi tutti i campioni, erano talmente basse da non consentire la successiva fase di amplificazione. Tra le tecniche di purificazione e di quantificazione del DNA, la tecnica fluorimetrica è risultata la più sensibile ed ha consentito di quantificare il DNA utilizzando piccole quantità di estratto (2 μ l per ciascun campione).

Come si è detto, i suoli analizzati in questo studio sono risultati caratterizzati da uno scarso contenuto in DNA. Questo è legato al fatto che si tratta di suoli prevalentemente sabbiosi (98% di sabbia), con netta predominanza della sabbia grossa sulla fine (Calcaric Arenosol, FAO, 1998) e quindi da uno scarso contenuto in argilla. Come già accennato precedentemente, in ambienti costituiti solo in minima parte da argilla risulta difficile lo svilupparsi di forme viventi, dato che un ambiente costituito da sola sabbia, per esempio, non è in grado di trattenere una quantità di acqua sufficiente per la vita dei microrganismi; inoltre il DNA si lega principalmente alle particelle di argilla, in particolare alla montmorillonite (Greaves e Wilson, 1969; Khanna e Stotzky, 1992; Romanowsky et al., 1991).

I suoli studiati sono risultati influenzati più dalla stagione di campionamento che dalla copertura vegetale. Infatti la biomassa microbica, la respirazione il qCO_2 , il CEM sono risultati, rispetto alla primavera, significativamente ridotti in autunno, quando il tenore idrico è risultato più basso. Al tenore idrico sono infatti risultati positivamente correlati la biomassa microbica, la respirazione, il quoziente metabolico ed il coefficiente di mineralizzazione endogena. Anche l'impronta catabolica, è risultata molto diversa tra le differenti stagioni, per ciascun tipo di copertura vegetale, mostrando, all'aggiunta dei

substrati organici, un incremento respiratorio medio più basso in autunno. In uno studio condotto su suoli prelevati in un'area a clima mediterraneo in California, Schimel et al. (1999) e Magid et al. (1999) hanno osservato che le variazioni di umidità influenzano le comunità microbiche del suolo determinando una riduzione della diversità funzionale e del tasso di mineralizzazione del carbonio. Questi autori sostengono che la riduzione del tasso di decomposizione potrebbe essere una conseguenza della variazione della composizione delle comunità microbiche indotta dalle variazioni di umidità. Effettivamente la composizione della comunità batterica, evidenziata dai profili DGGE, cambia con la stagione, presentando bande caratteristiche in autunno rispetto alla primavera. Le proprietà dei suoli analizzati (quali temperatura, umidità, disponibilità di substrati) nella stagione autunnale, dopo un lungo periodo di aridità estiva, sembrano aver favorito la dominanza di particolari specie batteriche, che non si esprimono nella stagione primaverile. La quantità di DNA è ridotta in autunno, rispetto alla primavera nei suoli della macchia e dell'arbusteto, mentre nel suolo del pratello è stato osservato il contrario. Analogamente Smalla et al. (2001) hanno osservato variazioni stagionali dell'abbondanza e della composizione delle popolazioni batteriche di suoli prelevati sotto diverse coperture vegetali, mediante DGGE. Indipendentemente dal tipo di copertura vegetale, questi autori hanno osservato che i profili di DGGE dei suoli prelevati in tempi diversi hanno presentato alcune bande in comune, ma anche marcate differenze nella composizione delle bande e quindi delle comunità batteriche. In particolare, i profili di DGGE ricavati dai suoli prelevati all'inizio del periodo vegetativo, erano caratterizzati dall'assenza di determinate bande che diventavano invece dominanti nei fingerprint relativi al campionamento successivo, cioè nel periodo corrispondente alla fioritura delle piante. Nei suoli esaminati in questo studio l'aridità estiva che ha preceduto il periodo in cui è stato effettuato il secondo campionamento potrebbe aver determinato le variazioni riscontrate nella composizione delle comunità batteriche. Probabilmente le condizioni di aridità stagionale esercitano una pressione selettiva sulle comunità batteriche, per cui le specie che hanno sviluppato meccanismi di adattamento a tali condizioni divengono dominanti rispetto alle altre.

Griffiths et al. (2003) hanno studiato l'effetto delle variazioni di umidità sulle comunità batteriche di suoli prelevati nella rizosfera di piante erbacee, sottoponendo i suoli a cicli controllati di essiccamento-riumidificazione, in laboratorio. L'attività catabolica all'aggiunta di alcuni substrati, misurata mediante piastre BIOLOG, sembrava essere direttamente influenzata dalle variazioni di umidità, mantenendo livelli elevati nelle fasi di

riumidificazione e riducendosi al minimo durante le fasi di essiccamento; la diversità genetica, valutata mediante elettroforesi su gradiente di gel denaturante (DGGE), non ha mostrato invece variazioni in funzione delle diverse condizioni di umidità. Gli autori sostengono che i risultati ottenuti mediante fingerprinting genetico delle comunità batteriche concordano con l'ipotesi che i batteri del suolo possono sviluppare meccanismi di adattamento alle variazioni di umidità mediante la regolazione delle attività cellulari (Meikle et al., 1995); essi inoltre sostengono che, nei suoli osservati, tutte le specie batteriche dominanti sono ugualmente capaci di sopravvivere alle condizioni di aridità e quindi non si instaura alcuna competizione interspecifica in seguito alle variazioni del contenuto idrico del suolo.

La maggiore intensità delle bande, osservata nei profili di DGGE dei suoli prelevati in autunno, rispetto a quelli prelevati in primavera, potrebbe indicare la presenza in questi di una più abbondante comunità batterica; ciò sembra essere in contrasto con i dati di biomassa microbica e, generalmente con quelli relativi alla quantità di DNA. Probabilmente le proprietà dei suoli prelevati ad ottobre, subito dopo il periodo di aridità estiva, determinano la presenza di comunità batteriche con una maggiore specializzazione, selezionando per gruppi che hanno sviluppato meccanismi di adattamento a tali condizioni e che presentano una maggiore diversità genetica, anche se questo non si traduce in una maggiore diversità funzionale, né in una maggiore biomassa o attività microbica, che al contrario risultano più basse in autunno. Bisogna considerare che le analisi di biomassa microbica e diversità funzionale non fanno distinzione tra comunità batteriche e fungine, mentre il metodo DGGE comporta l'utilizzo di primer eubatterici e quindi fornisce una misura che è relativa esclusivamente alle comunità batteriche. Inoltre tale metodo, diversamente dalle misure di biomassa microbica e diversità funzionale, non fa distinzione tra cellule vive e morte o cellule in uno stato di quiescenza.

Anche se il principale fattore limitante per la comunità microbica nell'area di studio è risultata la disponibilità idrica, alcune differenze sono state osservate anche tra suoli a diversa copertura vegetale. In particolare, i suoli della macchia hanno presentato valori più elevati, rispetto ai suoli dell'arbusteto basso e del pratello, di tenore idrico e di quoziente metabolico e, soltanto nel prelievo autunnale, di respirazione, di coefficiente di mineralizzazione endogena e, non significativamente, di contenuto di carbonio organico. Al contrario la biomassa microbica e l'indice di diversità funzionale non sono risultati influenzati dalla copertura vegetale in nessun campionamento. Rutigliano et al. (2004) in un'altra zona della Riserva Naturale di Castel Volturno hanno riscontrato un incremento di

carbonio organico, biomassa microbica e attività microbica ed una riduzione dei valori di qCO_2 e CEM dai suoli di macchia bassa a quelli di macchia alta, che riflettono il passaggio da stadi più precoci a stadi più maturi della successione ecologica. Altri autori hanno riportato sia una riduzione (Šantručková, 1992) che un aumento del quoziente metabolico (Bauhus et al., 1998) con il procedere della successione ecologica.

Anche l'impronta catabolica del suolo è risultata simile tra differenti tipi di copertura vegetale sia in primavera, che in autunno. Secondo Jones (1999), comunità microbiche diverse possono generare impronte cataboliche diverse. Degens (1999) ha inoltre riscontrato che il profilo di risposta catabolica può differire tra specie diverse cresciute nello stesso suolo. Non è possibile però affermare che suoli con lo stesso profilo di risposta catabolica abbiano necessariamente comunità microbiche simili. Infatti nei suoli a differente copertura vegetale prelevati ad ottobre, a profili di risposta catabolica simili corrisponde, come si è detto, una diversa composizione delle comunità microbiche, come risulta dai profili di DGGE. Infatti mentre in primavera i profili di DGGE non sono risultati sensibilmente influenzati dalla copertura vegetale, anche se i suoli della macchia e dell'arbusteto basso hanno mostrato una banda in più del suolo, e quindi una popolazione batterica in più, rispetto al pratello, in autunno le comunità batteriche del suolo hanno mostrato una differente composizione nei differenti tipi di copertura vegetale, presentando bande caratteristiche nei diversi suoli. Analogamente Smalla et al. (2001) hanno osservato un'influenza della copertura vegetale sulla composizione delle comunità microbiche del suolo, ed hanno spiegato tale risultato con il fatto che la presenza di specie vegetali diverse può determinare la presenza nel suolo di comunità batteriche differenziate.

Il fatto che non si osservino differenze particolarmente marcate nella comunità microbica nei differenti tipi di copertura vegetale, almeno non per tutti i parametri considerati, è probabilmente legato al fatto che le comunità vegetali considerate includono comunque sempre specie autoctone. La presenza di specie alloctone, come il pino, all'interno della macchia mediterranea ha invece determinato una più marcata alterazione sia della biomassa che dell'attività microbica del suolo rispetto ai siti di macchia pura, che includevano cioè solo specie autoctone (Rutigliano et al., 2004). Le differenze più marcate messe in evidenza da Rutigliano et al. (2004) tra suoli a macchia bassa e a macchia alta sono probabilmente dovute al fatto che l'area a macchia bassa, essendo localizzata sulla sommità di una duna costiera, risultava particolarmente limitata dal vento, che probabilmente inibiva l'ulteriore evoluzione del suolo.

6.6 CONCLUSIONI

I suoli analizzati sono risultati poveri di DNA, per questo probabilmente la tecnica di estrazione del DNA mediante lisi enzimatica è risultata particolarmente inefficace, rispetto alla tecnica di estrazione mediante lisi meccanica. Tra le tecniche di purificazione e di quantificazione del DNA, la tecnica fluorimetrica è risultata la più sensibile, in quanto ha consentito di quantificare il DNA utilizzando piccole quantità di estratto.

La comunità microbica è risultata influenzata più dalla variazione stagionale della disponibilità idrica che dalla copertura vegetale. Tuttavia in condizioni idriche limitanti l'eterogeneità spaziale della copertura vegetale ha influenzato la comunità microbica, che ha presentato valori di attività più elevati nel suolo della macchia che negli altri due tipi di copertura vegetale ed è risultata caratterizzata da una diversa composizione in popolazioni batteriche sia in suoli a diversa copertura vegetale che in suoli prelevati in differenti stagioni.

Infine i risultati di questo lavoro indicano che non c'è una relazione tra diversità genetica e diversità funzionale della comunità microbica, indicando che il funzionamento della comunità microbica non sia legato alla sua composizione.

CAPITOLO VII

CONCLUSIONI

7.1 CONCLUSIONI

La copertura vegetale è risultata un importante fattore di regolazione della microflora edafica nelle aree di studio. Infatti dopo non oltre due anni dall'introduzione di specie vegetali autoctone, mediante interventi di ingegneria naturalistica, su suoli del Parco Nazionale del Vesuvio nudi, acclivi e quindi soggetti ad elevata erosione, è stato già osservato un effetto positivo, anche se generalmente non significativo, sui microrganismi del suolo. Tuttavia da un studio condotto in questa tesi su suoli a diversa copertura vegetale, prelevati ugualmente nel Parco Nazionale del Vesuvio, è emerso che non tutti i tipi di piante esercitano nella stessa misura tale effetto stimolante: i suoli coperti da robinia per esempio, specie invasiva in ambiente mediterraneo, sono risultati caratterizzati da valori più bassi di biomassa ed attività microbica, non solo rispetto al suolo di un bosco di leccio, specie tipica della vegetazione matura nel bacino del mar Mediterraneo, ma anche rispetto al suolo di un bosco di pino, laddove il pino nell'area di studio è comunque una specie introdotta dall'uomo, anche se naturalizzata. Inoltre sia il suolo del robinieto che quello della pineta hanno presentato una minore diversità funzionale della comunità microbica rispetto alla comunità tipica dell'ambiente mediterraneo (lecceta).

L'effetto della copertura vegetale sulla microflora edafica è risultato influenzato dall'interazione con altri fattori ecologici, sia naturali che antropici, rispettivamente, la disponibilità idrica ed eventuali fattori di disturbo che hanno agito nel passato. Come è noto il mosaico di tipi di vegetazione, che caratterizza l'ambiente mediterraneo, è generalmente determinato da un disturbo antropico ricorrente, che, nell'area di studio, è rappresentato principalmente da incendio e taglio della vegetazione. In questo studio è stato osservato che la comunità erbacea che si è sviluppata dopo incendi di diversa intensità o in assenza di incendi e quindi presumibilmente dopo il taglio della vegetazione arbustiva non ha avuto lo stesso effetto sulla comunità microbica del suolo. Lo sviluppo di piante erbacee ha avuto un effetto positivo molto marcato su un suolo che era stato interessato da un incendio intenso quattro anni prima del campionamento, come dimostra il fatto che i valori più elevati di biomassa ed attività microbica (respirazione, qCO_2 e CEM) sono stati osservati in corrispondenza del massimo sviluppo delle piante erbacee. Lo sviluppo di piante erbacee ha avuto un effetto meno pronunciato nel caso che queste si siano sviluppate nel suolo interessato in passato da un incendio leggero o nel suolo non incendiato, dopo il taglio della vegetazione; in questi due suoli il principale fattore limitante è risultato essere l'aridità estiva, come dimostra il fatto che la biomassa e

L'attività microbica non abbiano presentato una dinamica legata allo sviluppo delle piante, ma piuttosto una dinamica legata alla disponibilità idrica, presentando una riduzione in corrispondenza del periodo arido. Si può ipotizzare che il suolo soggetto ad incendio intenso, risentendo ancora della perturbazione avvenuta quattro anni prima, come risulta dai valori di biomassa, attività e indice di uniformità catabolica della microflora edafica più bassi che negli altri due suoli, nei primi due campionamenti, ha presentato particolare giovamento dalla ricrescita della vegetazione. Questo suggerisce che a differenza degli incendi intensi, né gli incendi leggeri né il taglio della vegetazione, effettuato, almeno nelle aree protette, per ridurre l'incidenza di incendi accidentali, si configurano come fattori di disturbo per la comunità edafica. Questo risultato è anche confermato dal confronto tra la comunità microbica di suoli che presentavano una diversa copertura vegetale, in relazione del tempo trascorso dopo il taglio della vegetazione, rispettivamente un pratello, una comunità ad arbusti bassi e una comunità di macchia. Tali suoli sono risultati caratterizzati da una microflora edafica confrontabile per i valori di biomassa microbica e diversità funzionale, in entrambe le date di campionamento, cioè in primavera, dopo un lungo periodo umido, e all'inizio dell'autunno, al termine di una prolungata siccità estiva. Sia la biomassa microbica che il profilo delle risposte cataboliche sono apparse legate solo alla stagione di campionamento, presentando in autunno una riduzione di biomassa microbica e di incrementi respiratori medi all'aggiunta di substrati organici. Solo in condizioni idriche limitanti, la comunità microbica è risultata influenzata dalla copertura vegetale, presentando nella macchia valori più elevati, rispetto all'arbusteto basso e al pratello, di attività microbica e di velocità di mineralizzazione del carbonio organico e una diversa composizione, valutata attraverso il profilo DGGE, suggerendo che piccole differenze dovute alla copertura vegetale, non significative durante la stagione umida, vengano enfatizzate quando un altro fattore (l'acqua) diventa limitante.

I risultati di questa ricerca hanno anche messo in evidenza che la comunità microbica mostra una risposta ai cambiamenti dei fattori ambientali più marcata di quella della sostanza organica del suolo e quindi costituisce un indicatore più idoneo a rappresentare lo stato di salute del suolo. Tuttavia poiché i differenti parametri microbici non mostrano la stessa sensibilità alla variazione dei fattori ambientali, è opportuno considerare simultaneamente parametri che descrivano complessivamente la comunità stessa, ossia parametri indicatori del suo sviluppo (biomassa), della sua attività (respirazione) e della sua diversità.

Infine dal confronto tra la diversità funzionale e la diversità genetica della comunità microbica non è emersa una correlazione, dimostrando che nell'ambito della comunità microbica non esiste una stretta relazione tra funzionamento e composizione molecolare e probabilmente composizione in specie. Probabilmente negli studi sulla comunità microbica è più opportuno usare un approccio olistico, considerando la comunità microbica quasi come un superorganismo in grado di funzionare indipendentemente dalla sua composizione, anche se ovviamente tale capacità è garantita dalla elevata diversificazione genetica che le consente di produrre velocemente genotipi vincenti in un ambiente che cambia continuamente nello spazio e nel tempo.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Agostini M., 1975 - Ancora alcune considerazioni sugli aspetti giuridici della difesa del bosco e dei terreni sottoposti a vincolo idrogeologico. xxx, pag. 45.
- Akkermans A.D.L., van Elsas J.D., de Bruijn F.J., (1995). *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Amato M., Migliozi A., Mazzoleni S., 2004. *Il sistema suolo-vegetazione*. Liguori editore, Napoli.
- Alabouvette C., Hooper H., Lemanceau P., Steinberg C. (1996). Soil suppressiveness to diseases induced by soil-borne plant pathogens. In: G. Stotzky & J.-M. Bollag (Eds.), *Soil Biochemistry*, Vol. 9, Marcel Dekker, New York.
- Anderson J. P. E., 1982. Soil respiration. In: *Methods of soil analysis, part 2, Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Madison Wisconsin, pp. 831 – 871.
- Anderson T. H. and Domsch K. H., 1993. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 25, 393 – 395.
- Andren O. & Balandreau J., 1999. Biodiversity and soil functioning – from black box to can of worms? *Applied Soil Ecology*, 13, 105-108.
- Bolton H. Jr., Frederickson J.K., and Elliot L.F., 1993. *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management* (F.B. Meting, ed.), Marcel Dekker, New York, p. 27.
- Bååth E., Frostegård Å., Fritze H., 1992. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 4026-4031.
- Bardgett R. D., Leemans D. K., Cook R. and Hobbs P. J., 1997. Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. *Soil Biology & Biochemistry* 29 (8), 1285 – 1294.
- Bardgett R.D. & Shine A., 1999. Linkages between plant litter diversity, soil microbial biomass and ecosystem function in temperate grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 317-321.
- Boring L.R. & Swank W.T., 1984. Symbiotic nitrogen fixation in regenerating black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) stands. *Forest Science* 30 (2): 528 – 37.
- Brookes P.C., 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biology and Fertility of Soils*. 19: 269-279.
- Buonanno M., Esposito A., Mazzoleni S., 1993. La vegetazione della Riserva naturale di Castelvoturno (prov. di Caserta). *Giorn. Bot. Ital.* 127 (3): 172.
- Callaway R.M., Deluca, T.H., Belliveau W.M, 1999. Biological-control herbivores may increase competitive ability of the noxious weed *Centaurea maculosa*. *Ecology* vol. 80, pg 1196
- Ceccherini M.T., Pietramellara G. and Castaldini M. (2000). *Bollettino della Società Italiana della Scienza del Suolo* 49 (4): 753-761.
- Cheyland G. (1991) Patterns of Pleistocene turnover, current distribution and speciation among Mediterranean mammals. In: Groves RH, di Castri F (eds) *Biogeography of Mediterranean Invasions*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 227-262.
- Cheyland M., Poitevin F. (1993) Conservation of reptiles, frogs and toads. In: Monbailliu X (ed) *Environmental management of Mediterranean islands and coasts*. Medmaravis, Saint-Maximin.
- Coleman D.C. & Crossley D.A., 1996. *Fundamentals of Soil Ecology*. Academic Press, London.

- Chaussod R., Nicolardot B., Catroux G. e Cretien J. (1986). Relations entre les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques de quelques sols cultivés. *Science du Sol*, 2 : 213-226.
- Degens, B.P., 1998b. Microbial functional diversity can be influenced by the composition of simple organic substrates added to soil. *Soil Biology & Biochemistry* 30, 1981-1988.
- Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., Vojvodic-Vukovic, M. 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biol. Biochem.* 32: 189-196.
- Di Gennaro A., 2005. Piani imperfetti. Il caso del piano urbanistico della Provincia di Napoli. Clean Edizioni, Napoli.
- Doran J. W., Michael R., Zeiss, 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality.
- Dunbar J., Ticknor L.O. and Kuske C.R. (2000). Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (7): 2943-2950.
- Edwards C.A., Reichle D.E., Crossley D.A., 1970. The role of soil invertebrates in turnover of organic matter and nutrients. In: *Analysis of temperate Forest Ecosystems*, ed. D.E. Reichle, pp. 147-172. Springer Verlag, Berlin.
- Elliott E.T., Anderson R.V., Coleman D.C. e Cole C.V., 1980. Habitable pore space and microbial trophic interaction. *Oikos*, 35 : 327-335.
- Espósito, A., Mazzoleni, S., Strumia, S., 1999. Post-fire bryophyte dynamics in Mediterranean vegetation. *Journal of Vegetation Science* 10: 261-268.
- FAO/UNEP/UNESCO. 1979. A provisional methodology for soil degradation assessment. Rome: FAO.
- Fægri A., Torsvik L.V., Goksöyr J., 1977. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biology and Biochemistry* 9: 105-112.
- Florenzano G. (1983). *Fondamenti di microbiologia del terreno*, REDA, Roma.
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E., 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3605 – 3617.
- Freckman D.W. (ed) 1994. Life in the soil biodiversity: its Importance to Ecosystems Process. Report of a Workshop held at the natural History Museum, London, UK.
- Foster R.C., 1988. Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 6: 189-203.
- Giller, K.E., Beare, M.H., Lavelle, P., Izac, A.-M.N., Swift, M.J., 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Applied Soil Ecology* 6, 3-16.
- Griffiths B.S., Ritz K., and Glover L.A., 1996. *Microb. Ecol.* 31, p. 269.
- Griffiths R. I., Whiteley A. S., Anthony G. O'Donnell, and Bailey M.J., 2003. Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Applied and environmental microbiology*, Vol. 69, No. 12.
- Griffith B.S., Ritz K., Ebbelwhite N. and Dobson G., 1999. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 145-153.
- Hattori T. e Hattori R., 1976. The physical environment in soil microbiology. An attempt to extend principles of microbiology to soil microorganisms. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 4: 423-461.

- Horwath W.R. 1993. The dynamics of carbon, nitrogen and soil organic matter in a *Populus* plantation. Ph.D. Thesis. Michigan State University, East Lansing.
- Harris P.J., 1994. Beyond the Biomass (K. Ritz, J. Dighton, and K.E. Giller, eds.), Wiley, Chichester, England, p. 239.
- Hanlon R.D.G. & Anderson J.M., 1979. The effect of *Collembola* grazing on microbial activity in decomposition of leaf litter. *Oecologia* 38: 93-99.
- Higgins S.I., Richardson D.M., 1996. A review of models of alien plant spread. *Ecological Modelling* 87: 249-265.
- Insam H., 1990. Are the soil microbial biomass and basal respiration governed by climatic regime? *Soil Biology & Biochemistry* 22, 525 – 532.
- Insam H., Haselwandter K., 1989. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia* 79: 174-178.
- Jenkinson D.S. e Ladd J.N., 1981. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover. In: *Soil Biochemistry*, Ladd J.N. e Paul E.A. (Eds), Dekker, N.Y., pp. 415-471.
- Joseph S.J., Hugenholtz P., Sangwan P., Osborne C.A. & Janssen P.H. (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7210-7215.
- Kennedy A.C., Smith K.L., 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170: 75-86.
- Khanna M. and Stotzky G. (1992). Transformation of *B. subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of Dnase on the transformation ability of bound DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1930-1939.
- Killham K., 1994. *Soil Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kourtev, P.S., Ehrenfeld J. G., and Max Häggblom, 2002. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology*, 83 (11), pp. 3152-3166.
- Lavelle P. e Spain A.V., 2001. *Soil Ecology*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Lechevalier M.P., 1977. *Crit. Rev. Microbiol.* 5, 109-210.
- Liesack W., Janssen P.H., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. and Stackebrandt E. (1997). Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: *Modern Soil Microbiology*, (Van Elsas J.D., Trevors J.T. and Wellington E.M.H., Eds.), pp. 375-439. Marcel-Dekker, New York.
- Lorenz M. G. and Wackernagel W. (1987). Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2948-2952.
- Loreau M., Naeem S., Inchausti P., Bengtsson J., Grime J.P., Hector A., et al., 2001. Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science*. 294, 804 – 808.
- Magid J, Kjaergaard C., Gorissen A., Kuikman P. (1999). Drying and rewetting of a loamy sand soil did not increase the turnover of native organic matter, but retarded the decomposition of added ¹⁴C labelled plant material. *Soil Biol. Biochem.* 31: 595-602.
- Magurran A.E., 1988. *Ecological Diversity and Its Measurement*. Croom Helm, London.
- Marler, M.J. Zabinski, C.A., Callaway, R.M. 1999. Mycorrhizae indirectly enhance competitive effects of invasive forb on a native bunchgrass. *Ecology* 80 (4). Pp 1180 – 1186.

- Matson P., 1990. Plant-soil interactions in primary succession at Hawaii Volcanoes National Park. *Oecologia* 85: 241-246.
- Mazzoleni S., 1993. Incendi e vegetazione mediterranea. In "Introduzione all'ecologia degli incendi" a cura di S. Mazzoleni e G. Aronne. Liguri Editore.
- Meikle, A. S. Aminhanjani, L. A. Glover, K. Killham, and J.I. Prosser, 1995. Matric potential and the survival and activity of a *Pseudomonas fluorescens* inoculum in soil. *Soil Biol. Biochem.* 27: 881-892.
- Metting F.B., 1993. *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. (F.B. Metting, ed.), Marcel Dekker, New York, p. 3.
- Milewski A.V., Young Truman P., Madden D., 1991. Thorns as induced defenses: experimental evidence. *Oecologia* 86: 70-75.
- Miller R.M., Lodge D.J., 1997. Fungal responses to disturbance: Agriculture and forestry. In: *The Mycota IV. Environmental and microbial Relationship*. Wicklow/Soderstrom. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 65-79.
- Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695-700.
- Muyzer G., Smalla K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 127-141.
- Nannipieri P., Greco S., Dell'Agnola G. e Nardi S., 1990. Ciclo della sostanza organica nel suolo, aspetti agronomici, chimici, ecologici e selvicolturali. Patron (Ed).
- Nannipieri P., Kandeler E. & Ruggiero P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: *Enzymes in the Environment* (eds R.G. Burns & R. Dick), pp. 1-33. Marcel Dekker, New York.
- Nannipieri P., 1993. Ciclo della sostanza organica nel suolo. Patron editore, Bologna.
- Nannipieri P. and Badalucco (2003). Biological processes. In: *Processes in the soil-plant system: modelling concepts and applications* (Bembi D.K. and Nieder R., Eds.). TheHaworth Press, Binghampton, NY, in press.
- Nüsslein K. and Tiedje J.M. (1998). Characterization of the dominant and rare members of a young Hawaiian soil bacterial community with small-subunit ribosomal DNA amplified from DNA fractionated on the basis of its guanine and cytosine composition. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1283-1289.
- Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G. and Renella G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54, 655-670.
- Nannipieri P., Greco S. & Ceccanti B., 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. In: *Soil Biochemistry, Volume 6* (eds J.-M. Bollag & G. Stotzky), pp. 293-355. Marcel Dekker, New York.
- O'Donnell A.G., Seasman M., Macrae A., Waite I. & Davies J.T. 2001. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil*, 232, 135-145.
- Odum E. P., 1969. The strategy of ecosystem development. *Science* 164, 262 - 270.
- Odum E. P., 1985. Trends expected in stressed ecosystems. *Bioscience* 35, 419 – 422.
- Ogram A., Sayler G.S. and Barkay T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods* 7: 57-66.
- Olsen G.J., Woese C.R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.*, 7: 113-123.

- Othonen R., Aikio S., Väre H., 1997. Ecological theories in soil biology. *Soil Biology & Biochemistry* 29: 1613-1619.
- Øvreås L. and Torsvik V. (1998). Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb. Ecol.* 36: 303-315.
- Paul E.A., Clark F.E., 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego USA.
- Pietramellara G., Ascher J., Ceccherini M.T. and Renella G. (2002, b). Soil as a biological system. *Annals of Microbiology* 52: 119-131.
- Parkinson D., Visser S. & Wittaker J.B., 1979. Effect of collembolan grazing on fungal colonization of leaf litter. *Soil Biol. Biochem.* 11: 529-535.
- Paget E., Jocteur-Monrozier L. and Simonet P. (1992). Adsorption of DNA on clay minerals: protection against Dnase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiology Letters* 97: 31-40.
- Pietramellara G., Dal Canto L., Vettori C., Gallori E. and Nannipieri P. (1997). Effects of air-drying and wetting cycles on the transforming ability of DNA bound on clayminerals. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 55-61.
- Pankhurst C.E., Ophel-Keller K., Double B.M., Gupta V.V.S.R., 1996. Biodiversity of soil microbial communities in agricultural systems. *Biodiversity and Conservation* 5: 197-209.
- Pankhurst C.E., 1997. Biodiversity of Soil Organism as an indicator of Soil Health. IN: C.E.Pankhurst, B.M.Doube, & V.V.S.R. Gupta (Eds), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International: 419-435.
- Pyšek P., Jarošík V., Kučera T., 2002. Pattern of invasion in temperate nature reserves. *Biological Conservation* 104: 13-24.
- Ruggiero P., Dec J. & Bollag J.-M., 1996. Soil as a catalytic system. In: *Soil Biochemistry*, Vol. 9 (Eds J.-M. Bollag & G. Stotzky) pp. 79-122. Marcel Dekker, New York.
- Russell J.R., 1994. *Description and sampling of contaminated soils: a field guide*. Lewis Publishers.
- Rutigliano F.A., D'Ascoli R., Virzo De Santo., 2004. Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover. *Soil Biology & Biochemistry* 36 (11): 1719-1729.
- Smalla K., Wieland G., Buchner A., Zock A., Parzy J., Kaiser N., Roskot N., Heuer H., Berg G., 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed.
- Schimel JP, Gulledge JM, Clein-Curley JS, Lindstrom JE, Braddock JF (1999). Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. *Soil Biol. Biochem.* 31: 831-838.
- Smit E., Leeftang P., Wernars K. (1997). Detection of shifts in microbial community structure and diversity in soil caused by copper contamination using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23, 249-261.
- Stephen R.J., Goksøyr J., Bej A.K., Atlas R.M. (1998). Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2908-2915.
- Stephen J.R., Chang Y.J., Macnaughton S.J., Kowalchuk G.A., Leung K.T., Flemming C.A., White D.C., 1999. Effect of toxic metals on indigenous soil (-subgroup preteobacterium ammonia oxidizer community structure and protection against toxicity by inoculated metal-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 95-101.
- Solbrig, O. Y. (1991). From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity. Report of a IUBS – SCOPE – UNESCO workshop. The International Union of Biological Sciences, Paris.

- Stotzky G., 1997. Soil as an environment for microbial life. In: *Modern Soil Microbiology* (eds J.D. van Elsas, J.T. Trevors & E.M.H. Wellington), pp. 1-20. Marcel Dekker, New York.
- Sait M., Hugenholtz P. & Janssen P.H. (2002). Cultivation of genetically distinct soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in culture-independent surveys. *Environmental Microbiology* 4, 654-666.
- Schmid B., Joshi J., Schläpfer F. 2002a. Empirical evidence for biodiversity-ecosystem functioning relationships. In: Kinzig, A., Pacala S., Tilman D. (Eds.). *Functional Consequences of Biodiversity: Experimental Progress and Theoretical Extension*. Princeton University Press, Princeton, pp. 120-150.
- Sparling G. P., 1985. The soil biomass. In: Vaughan D. and Malcolm R. E. (eds) *Soil organic matter and biological activity*. Nijhoff/Junk, Dordrecht, The Netherlands.
- Swift M.J., Heal O.W., Anderson J.M., 1979. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. Blackwell University of California Press, Berkeley, CA..
- Tate III R. L. and Rogers B. F., 2002. Soil ecosystem properties, microbial diversity, and ecosystem assessments. In: *Soil mineral – organic matter – microorganism interactions and ecosystem health*, Violante A., Huang P. M., Bollag J. M. and Gianfreda L. (eds). *Developments in Soil Science* 28 b, Elsevier Science, B. V. pp. 79 – 93.
- Tiedje J.M., Cho J.C., Murray A., Treves D., Xia B. & Zhou J. 2001. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: *Sustainable Management of Soil Organic Matter* (eds R.M. Rees, B.C. Ball, C.D. Campbell & C.A. Watson), pp. 393-412. CAB International, Wallingford.
- Tolba M.K., 1992. *Saving our planet. Challenges and hopes*. Chapman & Hall ed., London.
- Torsvik V.L., Goksøyr J., Daae F.L., Sørheim R., Michalsen J. and Salte K. (1994). Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities. In: *Beyond the Biomass: Compositional and functional analysis of soil microbial communities* (K. Ritz, J. Dighton and K.E. Giller, Eds.), pp. 39-48. JohnWiley & Sons, New York.
- Torsvik V.L., Goksøyr J. and Daae F.L. (1990). High diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 782-787.
- Torsvik V.L., Sørheim R. and Goksøyr J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review. *Journal of Industrial Microbiology* 17: 170-178.
- Van Veen J. A., Heijnen C. E. 1994. The fate and activity of microorganism introduced into soil. In: *Soil biota management in sustainable farming systems*. Ed. Pankhurst
- Voous KH (1960) *Atlas of European birds*. Nelson, Edinburgh.
- Zak J.C., Willing M.R., Moorhead D.L., Widman H.G., 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology & Biochemistry* 26: 1101-1108.
- ZaK D.R., Holmes W.E., White D.C., Peacock A.D., Tilman D., 2003. Plant diversity, soil microbial communities and ecosystem function: are there any links? *Ecology* 84, 2042-2050.
- Walker L.R. and Vitousek P.M., 1991. An invader alters germination and growth of a native dominant tree in Hawai'i. *Ecology* 72(4): 1449-1455.
- Warcup J.H., 1957. In: *The ecology of soil-borne plant-pathogens* (Ed. Baker, Snyder), Univ. California, Press, 52-67, 1965.
- Weete J.D., 1980. *Lipid biochemistry of fungi and other organisms*. Plenum Press, New York.
- Williamson and Fitter, 1996. The characters of successful invaders. *Biological conservation* 78: 163-170.

INDICE

ABSTRACT.....	I
CAPITOLO I - INTRODUZIONE.....	1
1.1 - IL SUOLO COME SISTEMA BIOLOGICO.....	2
1.2 - DIVERSITA' DELLE COMUNITA' MICROBICHE DEL SUOLO.....	8
1.3 - FATTORI CHE INFLUENZANO DIVERSITA', SVILUPPO E ATTIVITA' DELLA COMUNITA' MICROBICA DEL SUOLO.....	11
1.3.1 - INFLUENZA DELLA COPERTURA VEGETALE SULLO SVILUPPO, L'ATTIVITA' E LA DIVERSITA' DELLA COMUNITA' MICROBICA DEL SUOLO.....	15
1.4 - METODI DI STUDIO DELLE COMUNITA' MICROBICHE.....	18
1.4.1 - DIVERSITÀ DELLA COMUNITÀ MICROBICA.....	18
1.4.1.1 - TECNICHE PER LA DETERMINAZIONE DELLA DIVERSITÀ FUNZIONALE DELLA COMUNITÀ EDAFICA.....	18
1.4.1.2 - TECNICHE MOLECOLARI PER LA VALUTAZIONE DELLA DIVERSITA' GENETICA DELLA COMUNITÀ EDAFICA.....	20
1.4.1.3 - DETERMINAZIONE DEL PROFILO DEGLI ACIDI GRASSI PER LA STIMA DELLA DIVERSITÀ STRUTTURALE DELLA MICROFLORA EDAFICA.....	24
1.4.2 - BIOMASSA MICROBICA.....	25
1.4.3 - ATTIVITÀ MICROBICA.....	26
1.5 - L'AMBIENTE MEDITERRANEO.....	28
1.5.1 - DIVERSITÀ IN AMBIENTE MEDITERRANEO.....	28
1.5.2 - FATTORI DI DISTURBO NEL BACINO DEL MAR MEDITERRANEO.....	31
CAPITOLO II - OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	35
2.1 - OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	36
CAPITOLO III - EFFETTO DELL'INTRODUZIONE DI UNA SPECIE VEGETALE INVASIVA SULLA MICROFLORA EDAFICA.....	41
3.1 - PREMESSA.....	42
3.2 - MATERIALI E METODI.....	45
3.2.1 - AREA DI STUDIO.....	45
3.2.2 - ANALISI DEL SUOLO.....	46
3.2.3 - ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI.....	49
3.3 - RISULTATI.....	50
3.4 - DISCUSSIONE.....	54
3.5 - CONCLUSIONI.....	57
CAPITOLO IV - EFFETTO DELL'INTRODUZIONE DI SPECIE VEGETALI AUTOCTONE, REALIZZATA MEDIANTE INTERVENTI DI INGEGNERIA NATURALISTICA, SULLA COMUNITA' MICROBICA DEL SUOLO.....	58
4.1 - PREMESSA.....	59

4.2 - MATERIALI E METODI.....	63
4.2.1 - AREA DI STUDIO E DISEGNO SPERIMENTALE.....	63
4.2.2 - ANALISI DEL SUOLO.....	66
4.2.3 - ELABORAZIONE DEI DATI.....	67
4.2.4 - RISULTATI	67
4.2.5 - DISCUSSIONE.....	71
4.3 - CONCLUSIONI.....	73
CAPITOLO V - EFFETTO DEL CICLO VITALE DI PIANTE ERBACEE SULLA MICROFLORA DI SUOLI SOGGETTI AD INCENDI.....	75
5.1 - PREMESSA.....	76
5.2 - MATERIALI E METODI.....	78
5.2.1 - AREA DI STUDIO.....	78
5.2.2 - ANALISI DEL SUOLO.....	82
5.2.3 - ELABORAZIONE STATISTICA DEI DATI.....	82
5.3 - RISULTATI.....	83
5.4 - DISCUSSIONE.....	88
5.5 - CONCLUSIONI.....	93
CAPITOLO VI - DIVERSITA' FUNZIONALE E GENETICA DELLA MICROFLORA IN SUOLI DI AREE A DIVERSO STADIO SUCCESSIONALE.....	94
6.1 - PREMESSA.....	95
6.2 - MATERIALI E METODI.....	96
6.2.1 - AREA DI STUDIO.....	96
6.2.2 - ANALISI DEL SUOLO.....	97
6.2.2.1 - ESTRAZIONE DEL DNA TOTALE DAL SUOLO.....	98
6.2.2.2 - CARATTERIZZAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEL DNA ESTRATTO.....	100
6.2.2.2.1 - TECNICA ELETTROFORETICA – DISCUSSIONE DEL METODO E CONDIZIONI IMPIEGATE.....	101
6.2.2.2.2 - TECNICA SPETTROFOTOMETRICA – DISCUSSIONE DEL METODO E PROCEDURA.....	102
6.2.2.2.3 - TECNICA FLUORIMETRICA.....	103
6.2.2.3 - AMPLIFICAZIONE DEL DNA MEDIANTE PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION).....	104
6.2.2.4 - DGGE (DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS).....	106
6.3 - ELABORAZIONE DEI DATI.....	109
6.3.1 - PARAMETRI CHIMICI E BIOLOGICI.....	109
6.3.2 - ANALISI DEI DGGE – FINGERPRINTS.....	109
6.4 - RISULTATI.....	111
6.4.1 - ASPETTI METODOLOGICI RELATIVI ALLA DETERMINAZIONE DELLA DIVERSITÀ GENETICA DELLA MICROFLORA EDAFICA.....	111
6.4.2 - EFFETTO DELLA COPERTURA VEGETALE E DELLA STAGIONE DI CAMPIONAMENTO	

SULLA MICROFLORA EDAFICA.....	114
6.5 - DISCUSSIONE.....	120
6.6 - CONCLUSIONI.....	124
CAPITOLO VII - CONCLUSIONI	125
7.1 - CONCLUSIONI.....	126
BIBLIOGRAFIA	129